

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Bactérias na água de abastecimento da cidade de Piracicaba

Marina Gumiere Alves

Dissertação apresentada para, obtenção do título
de Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2007

Marina Gumiere Alves
Bióloga

Bactérias na água de abastecimento da cidade de Piracicaba

Orientador:
Prof. Dr. **FLAVIO CESAR ALMEIDA TAVARES**

Dissertação apresentada para, obtenção do título
de Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2007

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Alves, Marina Gumiere

Bactérias na água de abastecimento da cidade de Piracicaba / Marina Gumiere Alves. - -
Piracicaba, 2007.

101 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Abastecimento de água 2. Bactérias – Identificação 3. Bactérias patogênicas
Ecologia microbiana 5. Microbiologia da água 6. Qualidade de vida I. Título

CDD 628.16

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Edimilson e Eva**, verdadeiros exemplos de amor, garra, perseverança e honestidade. Heróis que sempre lutaram para que fossemos os melhores;*

*Aos meus irmãos, **Silvio e Thiago**, por serem meus companheiros em todos os momentos e iluminarem a minha vida pelo simples fato de existirem;*

*Ao meu amor, **Edson**, por ser a minha luz, meu melhor amigo e sempre estar ao meu lado me apoiando.*

*Sem vocês nada faz sentido... Com vocês tudo é possível...
Por vocês tudo vale a pena...*

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por sempre estar ao meu lado e porque sem Ele nada é possível.

Aos meus pais, Edimilson e Eva, pelos conselhos, pelo apoio nos momentos mais difíceis, pelas orações e pelo amor incondicional.

Ao meu irmão Silvio por me mostrar que era possível, e que mesmo distante me ajudou muito nas correções desta dissertação, e a minha cunhada Adriana pelo carinho e apoio.

Ao meu irmão Thiago, por ser meu amigão de todos os dias, e sem o qual as coletas certamente não teriam sido as mesmas.

Ao meu marido Edson, por ter aceitado com carinho a minha ausência, os meus momentos de stress e pelo seu amor.

Ao Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares, pela orientação, paciência, incentivo e principalmente pela oportunidade.

Ao Dr. Luiz Humberto Gomes, pela amizade, carinho, paciência incondicional, incentivo e por me mostrar que com trabalho e dedicação tudo é possível.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Ao José Maria, Ivan, Carlinhos, Rosinaldo e toda a equipe do SEMAE pelo apoio, mas principalmente pela confiança e por terem permitido a realização deste trabalho.

A Prof. Dra. Maria Helena Santini Campos Tavares por me incentivar a iniciar este sonho.

A Nirlei e Helena e toda a equipe do Laboratório de Zootecnia, pela realização dos sequenciamentos, mas principalmente pelo apoio, incentivo, e amizade.

Aos amigos que conquistei nesta caminhada, Ana Maria, Marcos Gorga, Felipe, Natália, Ana Carolina, Keila, Jupara, Silmara, Lia, Aninha e as meninas Rebeca, Sara, Ana Luiza e Leila.

À Coordenação do PPG- Microbiologia Agrícola e a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela oportunidade da realização deste projeto.

A todos os amigos do PPG-Microbiologia Agrícola, principalmente, Giovana, Luiz Fernando, Simone, Rafael, Nívea, Mauricio.

A todos os amigos cujos nomes não foram citados, gostaria de agradecer o carinho e o incentivo.

OBRIGADA A TODOS!

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 DESENVOLVIMENTO.....	14
2.1 Revisão de Literatura.....	14
2.1.1 Aspectos Gerais.....	14
2.1.2 Tratamento e determinação da potabilidade da água.....	15
2.1.3 Distribuição e contaminação da água de abastecimento	19
2.1.4 Técnicas moleculares para identificação de microrganismos.....	21
2.2 Material e Métodos.....	24
2.2.1 Área do estudo.....	24
2.2.2 Plano de amostragem.....	26
2.2.3 Meios de cultura, soluções, tampões e géis.....	26
2.2.4 Métodos analíticos para as análises microbiológicas	29
2.2.4.1 Pesquisa de coliformes totais e fecais.....	30
2.2.4.2 Contagem de microrganismos mesófilos estritos e facultativos viáveis	30
2.2.4.3 Contagem de microrganismos oligotróficos.....	30
2.2.5 Análise molecular através da região 16S rDNA.....	31
2.2.5.1 Extração do DNA das colônias isoladas.....	31
2.2.5.2 Extração do DNA diretamente da água	31
2.2.5.3 Amplificação dos DNAs obtidos a partir dos dois métodos de extração	32
2.2.5.4 Preparação da fita simples de DNA, do sistema de eletroforese e coloração do gel.....	32
2.2.5.5 Análise das bandas, isolamento e amplificação dos fragmentos de DNA a partir do gel de SSCP.....	33
2.2.5.6 Purificação e quantificação dos produtos de PCR para a reação de sequenciamento	33
2.2.5.7 Sequenciamento e análises da seqüências	34
2.3 Resultados e Discussão.....	35
2.3.1 Análises da concentração de cloro livre	35

2.3.2 Análises para a determinação da potabilidade.....	38
2.3.3 Contagem de microrganismos utilizando o meio R2A.....	41
2.3.4 Pesquisa de bactérias utilizando a técnica do SSCP.....	44
2.3.5 Resultado do sequenciamento	46
2.3.5.1 Comparação entre os três métodos utilizados na identificação de bactérias no sistema de distribuição	46
2.3.5.2 Frequência dos microrganismos presentes em todo o sistema de distribuição de água potável	53
3 CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS	71
ANEXOS	80

RESUMO

Bactérias na água de abastecimento da cidade de Piracicaba

Espera-se que a água esteja dentro de um padrão de qualidade após passar pelos processos de tratamento, que deve ser mantido durante a distribuição chegando aos pontos de consumo em condições de jamais prejudicar a saúde humana e animal. Contudo, há vários problemas de saúde que mundialmente vêm sendo associados ao suprimento público de água, fato que tem exigido um controle de qualidade cada vez mais rigoroso. Apesar dos recursos analíticos disponíveis, que facilitam a detecção e quantificação de agentes físicos, químicos e microbiológicos potencialmente perigosos à saúde, há grande dificuldade em estabelecer parâmetros de qualidade e definir índices toleráveis daquilo que se consideram como agentes potencialmente perigosos à saúde. Muitas doenças veiculadas pela água são causadas por bactérias principalmente do grupo entérico, cuja presença é determinada através de indicadores como os coliformes totais e termotolerantes. Outros microrganismos patogênicos podem estar presentes e não serem detectados por não estarem associados a estes indicadores. Como somente uma pequena quantidade de bactérias pode ser cultivada, como demonstrado pela avaliação direta de fragmentos de genomas, tornou-se evidente que em várias situações muitas espécies microbianas embora presentes deixem de ser detectadas. Como ainda não se dispõe de informações suficientes a este respeito, este trabalho teve o objetivo de comparar métodos de identificação de bactérias cultiváveis e incultiváveis que possam comprometer a qualidade da água, analisando-se amostras coletadas ao longo do sistema de abastecimento da cidade de Piracicaba, desde a captação e processo de tratamento, distribuição e estocagem residencial da água de abastecimento, o que permitiria avaliar possíveis fontes de contaminação ao longo do trajeto nas redes de distribuição até os pontos de consumo. Amostras foram coletadas nas épocas de chuvas e seca para avaliar a qualidade da água de abastecimento e os resultados mostram que as bactérias presentes no sistema de abastecimento da cidade é 61,29% maior como estimado por SSCP em relação aos métodos de cultivo testados, sendo que o cultivo em meio R2A apresentou contagens médias superiores ao cultivo em meio TSA. Bactérias patogênicas potenciais como *Shigella flexneri* e *Sphingomonas sp.* mostraram resistência aos processos de tratamento e purificação da água, sendo identificadas em muitos pontos no sistema de abastecimento de água da cidade e nas amostras dos reservatórios domiciliares. Bactérias como *Salmonella typhi*, *Salmonella sp.* e *Staphylococcus aureus* foram identificadas apenas em amostras coletadas na rede, ou seja, não detectadas na amostra do ponto de captação, indicando uma provável contaminação no trajeto de distribuição da água tratada. Contudo uma maior preocupação é voltada aos reservatórios domiciliares, pois algumas amostras apresentaram uma concentração de cloro abaixo do limite mínimo exigido em Portaria e, também, a presença de microrganismos patogênicos potenciais como os pertencentes ao Grupo Entérico. Estes dados revelam que apesar do eficiente sistema de tratamento da cidade, existem microrganismos que resistem aos processos de tratamento disseminando-se pela rede e que há possíveis focos de contaminação na rede de distribuição da água, podendo comprometer a qualidade da água disponível ao consumo público.

Palavras-chave: Água de abastecimento; Microrganismos não cultiváveis; rDNA 16S; SSCP.

ABSTRACT

Bacteria in water supply from Piracicaba city

It is expected that the water be within the quality standards after being through the treatment processes, which must be maintained along its distribution system up to the consumption points under the same conditions. However, there are several health problems worldwide associated to the public water supply. This fact has required a more and more rigorous quality control. It is difficult to set quality parameters and to define tolerant levels of what is considered as agents potentially dangerous to health, even if the analytical resources used to detect and quantify these chemical, physical, and microbiological agents are available. Bacteria, mainly from the enteric group, cause many diseases disseminated through water. Its presence is determined by using indicators, such as, total and thermo-tolerant coliforms. Other pathogenic microorganisms can be present in water without being detected, because they are not associated to those indicators. Just a small amount of bacteria can be cultivated, as demonstrated by direct evaluation of genome fragments. It is evident that in several situations many microbial species are not detected, even being present in the environment. As there is not enough information available, this work aimed to compare the identification methods of cultivated and non-cultivated bacteria that can damage the water quality. The samples were collected along the water supply system from Piracicaba, São Paulo, from the collection site, treatment process, and distribution to domestic reservoirs in order to check possible sources of contamination throughout the distribution system up to the consumption points. Samples were collected in the rainy and dry seasons to evaluate the quality of water supply. The results demonstrated that the population of bacteria present in the supply system from the city is 61.29% higher than that estimated by SSCP. In relation to the cultivation methods under testing, R2A medium presented higher average counting when compared to TSA medium. Potentially pathogenic bacteria, such as, *Shigella flexneri* and *Sphingomonas sp.*, demonstrated resistance to water treatment and purification processes. These microorganisms were identified in several points along the city water supply system and in the samples collected from the domestic reservoirs. Bacteria, such as, *Salmonella typhi*, *Salmonella sp.* and *Staphylococcus aureus* were identified only in some samples collected along the distribution system, that is, they were not detected in the samples from the collecting point. This fact indicates that there might have been a contamination along the distribution of treated water. However, an important concern is towards the domestic reservoirs, because some samples presented a lower concentration of Chlorine than the minimum amount required by law, and the presence of potentially pathogenic microorganisms from the enteric group. These data reveal that, despite the efficiency of the water treatment system in the city, there are microorganisms resistant to the treatment processes, and they are disseminated through the distribution pipes. There might be possible contamination focuses along the distribution pipes that can damage the quality of water available to the public consumption.

Keywords: Supply water; Non-cultivated microorganisms; rDNA 16S; SSCP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema geral do processo de tratamento de água realizado nas ETA.....	16
Figura 2 - Pontos amostrados no ETA 3 e na rede de distribuição.	24
Figura 3 - Foto de gel de SSCP de amostras da primeira coleta.	45
Figura 4 - Foto de gel de SSCP de amostras da segunda coleta.....	45
Figura 5 - Amostras amplificadas a partir das bandas retiradas do gel de SSCP.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Localização e identificação das residências abastecidas pelo ETA 3.	25
Tabela 2 - Localização e identificação das estações de bombeamento abastecidas pelo ETA 3. .	26
Tabela 3 – Variação da concentração de cloro livre nas estações de bombeamento.....	36
Tabela 4 – Teste de significância entre as concentrações de cloro das água de distribuição e armazenadas das estações de bombeamento.....	36
Tabela 5 – Variação da concentração de cloro livre nas residências.....	36
Tabela 6 – Teste de significância entre as concentrações de cloro das água de distribuição e armazenadas das residências.....	37
Tabela 7 - Resultados obtidos nas amostras coletadas na ETA 3 na primeira coleta.....	39
Tabela 8 - Resultados obtidos nas amostras coletadas na ETA 3 na segunda coleta.	39
Tabela 9 - Resultado da contagem total de microrganismos nos meios TSA e R2A nas amostras residenciais da primeira coleta	42
Tabela 10 - Resultado da contagem total de microrganismos nos meios TSA e R2A nas amostras das estações de bombeamento da primeira coleta.	43
Tabela 11 - Resultado da contagem total de microrganismos nos meios TSA e R2A nas amostras residenciais da segunda coleta.....	43
Tabela 12 - Resultado da contagem total de microrganismos nos meios TSA e R2A nas amostras das estações de bombeamento da segunda coleta.....	44
Tabela 13 - Ocorrência das Espécies identificadas pelos três métodos no sistema de abastecimento – Primeira Coleta	47
Tabela 14 - Ocorrência das espécies identificadas pelos três métodos no sistema de abastecimento – segunda coleta	49
Tabela 15 - Frequência dos microrganismos presentes no sistema de abastecimento – primeira coleta.....	56
Tabela 16 - Frequência dos microrganismos presentes no sistema de abastecimento – segunda coleta.....	62

1 INTRODUÇÃO

A água para o abastecimento das cidades obedece a critérios definidos em leis para atender aos requisitos de qualidade exigidos que deve ser observados pelas Estações de Tratamento de Água (ETA), onde passa por processos físicos e químicos antes de sua distribuição, esperando-se que chegue aos pontos de consumo em condições de jamais prejudicar a saúde humana e animal. Contudo, problemas de saúde vêm sendo mundialmente associados ao suprimento público de água, o que tem exigido um controle de qualidade cada vez mais rigoroso e uso de recursos analíticos mais sofisticados para facilitar a detecção e quantificação de agentes físicos, químicos e microbiológicos potencialmente perigosos à saúde. Apesar dos recursos disponíveis para o tratamento e controle de qualidade da água, ainda há grande dificuldade em definir índices toleráveis daquilo que se consideram como agentes potencialmente perigosos à saúde, principalmente quando se aproveitam mananciais de superfície sujeitos a diferentes agentes de poluição ou contaminação, sejam naturais ou artificiais.

O controle analítico e o monitoramento da água tratada devem ser realizados com rigor, com frequência e em pontos específicos de amostragem, pois muitos fatores contribuem para comprometer as propriedades da água, representados pela carga poluidora variável que pode ser maior ou menor dependendo do regime das chuvas, problemas na distribuição e falhas imprevisíveis que podem prejudicar o tratamento da água ou promover nova contaminação em várias etapas do abastecimento ou estocagem prévia ao consumo. Sabe-se que as propriedades físicas, químicas e microbiológicas da água que chega às estações de tratamento são muito variáveis de região para região e sujeitas a apresentarem poluentes originários ou não da atividade antrópica, citando-se como mais importantes as contaminações por metais pesados, substâncias orgânicas prejudiciais à saúde resultantes de resíduos industriais, agroquímicos de variadas composições, a contaminação por esgoto não tratado e lixo depositado inadequadamente. Em regiões mais densamente povoadas o problema se agrava em função da maior escala com que são produzidos agentes potenciais de poluição e contaminação da água. Os controles analíticos para determinação da qualidade da água, compreendem a monitoração de compostos químicos a partir da quantificação de substâncias inorgânicas, como cádmio e arsênico, substâncias orgânicas, como benzeno e acrilamida, agroquímicos, como metolacoloro e atrazina, desinfetantes e produtos secundários da desinfecção, como o cloro e pH. O controle físico da água deve obedecer a padrões de cor e turbidez que denotem a presença de impurezas

indesejáveis e o controle microbiológico é baseado em análises de identificação e quantificação de bactérias indicadoras de contaminação fecal e contagem total de microrganismos heterotróficos, cistos de *Giardia spp*, oocistos de *Cryptosporidium sp.*. Mais recentemente pesquisas vêm indicando a ocorrência de cianotoxinas produzidas por diferentes espécies de Cianobactérias que podem se proliferar exageradamente, também como resultados da atividade antrópica.

No que se refere aos problemas de natureza microbiológica, há registros mostrando que espécies microbianas de comunidades naturais podem resistir às etapas de tratamento e associar-se a outros organismos ou a partículas sólidas em suspensão, formando comunidades microbianas altamente resistentes presentes na forma de biofilmes, que se protegem da ação de desinfetantes como o cloro e outros processos de tratamento. A maioria das doenças veiculadas pela água é causada por bactérias, principalmente as do grupo entérico, geralmente presentes no esgoto, a presença destas bactérias são determinadas através de indicadores, como coliformes totais e termotolerantes. Mas sabe-se que muitos outros microrganismos patogênicos não pertencentes a este grupo podem estar presentes em ambientes aquáticos e não serem detectados por não estarem associados a estes indicadores. A sobrevivência e o crescimento de microrganismos no sistema de distribuição de água potável comprometem a qualidade da água o que justificaria fazer a identificação de microrganismos veiculados nas águas tratadas, a avaliação da eficácia dos processos de tratamento nas estações e determinar possíveis fontes de contaminação microbiana nas redes de abastecimento das cidades.

Estudos mais recentes têm mostrado que somente uma pequena quantidade de bactérias pode ser cultivada através dos métodos de enriquecimento atualmente existentes, fato revelado por métodos que independem do cultivo, como aqueles baseados nas seqüências de bases de genes do DNA ribossômico (rDNA), e metodologias como PCR e SSCP, que permitem identificar vários microrganismos pela comparação de seqüências gênicas com as existentes em bancos de dados de domínio público. Este recurso técnico tornou evidente que em várias situações muitas espécies microbianas deixam de ser detectadas, seja devido ao seu título muito baixo, ou pela incapacidade de crescer em meios seletivos e nas condições laboratoriais.

Considerando os problemas supramencionados, neste trabalho foram coletadas amostras de água de abastecimento da cidade de Piracicaba em duas épocas do ano (chuvas e seca), que foram analisadas visando à identificação de bactérias cultiváveis e incultiváveis, desde a

captação, processo de tratamento na Estação de Tratamento de Água Capim Fino (ETA 3) – SEMAE, distribuição e estocagem residencial. O planejamento da amostragem da água de abastecimento foi feito, visando identificar possíveis fontes de contaminação ao longo da rede de distribuição até os pontos de consumo.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão de Literatura

2.1.1 Aspéctos gerais

A água é um dos recursos naturais mais utilizados pela humanidade, a relação entre água, higiene e a saúde humana é um conceito que acompanha o gênero humano desde o início da civilização. Acredita-se que a preocupação com as práticas sanitárias iniciou-se na Índia a cerca de 4000 anos atrás e segue-se até os dias de hoje (ROSEN, 1993). Água potável é aquela que deve estar límpida, inodora e sem sabor, livre de substâncias tóxicas e microrganismos prejudiciais à saúde (BRASIL, 2004). No Brasil cerca de 80% do esgoto é lançado nos rios e mares e este é um dos maiores problemas de contaminação, pois muitas doenças relacionadas à água como febre tifóide, cólera, entre outras, estão relacionadas a esta prática (PALMA, 1999; TYRREL; QUINTON, 2003). Este fato tem conduzido a muitas pesquisas visando no entendimento e prevenção da contaminação da água por microrganismos patogênicos, testando barreiras mais efetivas nos processos de desinfecção que minimizem a exposição ao risco do consumo de água contaminada (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - EPAs, 1993; ARVANITIDOU et al., 2003).

A poluição dos rios e lagos que abastecem as cidades se agravam a cada dia, e a falta de tratamento do esgoto e lixo depositado inadequadamente é uma das principais causas de poluição, mas esta situação aumenta ainda mais pelo uso de agroquímicos nas plantações ao seu redor e o desmatamento das matas ciliares (PALMA, 1999). A maioria dos microrganismos que estão presentes no esgoto são patógenos e os mais conhecidos são *Salmonella typhi*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Streptococcus*, *Legionella* e *Vibrio Cholerae* (DECKER, 1964; CHAVES, 2004). Geralmente as espécies microbianas encontradas no ambiente aquático são determinadas pelas condições físicas, químicas, biológicas e nutricionais que prevalecem na água, à concentração de poluentes, por exemplo, pode determinar a proporção de certas espécies microbianas no ambiente (DECKER, 1964). O regime das chuvas também pode influenciar na carga microbiana presente, pois quanto maior os níveis de precipitações maior será o arrasto, este fato indica que o ambiente aquático é bastante instável e isto pode influenciar no metabolismo microbiano deixando-os mais adaptáveis ao meio (CHAVES, 2004).

A cidade de Piracicaba localizada no Estado de São Paulo é abastecida por dois mananciais, o Rio Piracicaba e o Rio Corumbataí, entretanto 95% da água utilizada pelo município provem do Rio Corumbataí, este passa por sete cidades, antes de chegar a Piracicaba, recebendo boa parte de poluentes gerados por estes municípios à montante (PALMA, 1999). Como a diversidade e a densidade de microrganismos transportada pela água são grandes (TYRREL; QUINTON, 2003), estima-se que a carga microbiana que chega para abastecer Piracicaba seja alta, sendo assim antes de ser disponibilizada para o consumo a água deve ser devidamente tratada e purificada para que não ofereça risco à saúde pública. A fonte de água a ser utilizada no abastecimento público deve apresentar-se com qualidade e volume suficiente (PARSEKIAN, 1998; DI BERNARDO; DANTAS, 2005). O Conselho Nacional do meio Ambiente (CONAMA), através da Resolução nº 357, classifica os mananciais de água para abastecimento em todo o Brasil, e para cada uma das classes estão estabelecidos limites para os parâmetros de qualidade. De acordo com a classe pertencente é possível indicar quais as possíveis alternativas de tratamento que poderão ser adotados a fim de torná-la potável (PARSEKIAN, 1998).

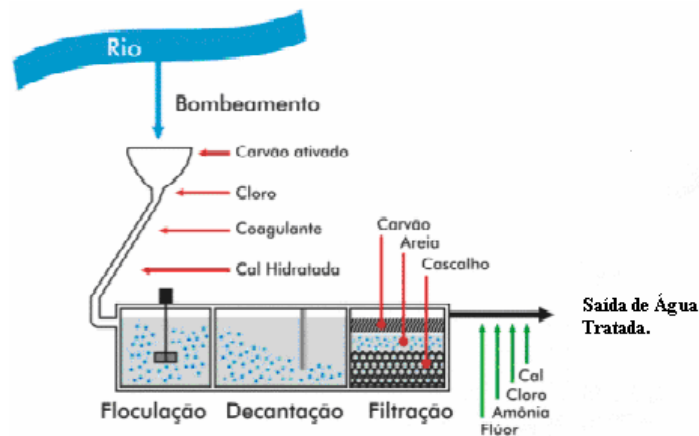
2.1.2 Tratamento e determinação da potabilidade da água

A água para o consumo humano deve ser potável, que significa estar livre de microrganismos patogênicos ou substâncias que possam prejudicar a saúde (PARSEKIAN, 1998). Isto demanda que sejam utilizados processos de tratamento que tornem os parâmetros físicos, químicos e microbiológicos coerentes com indicadores de qualidade. Estes processos compreendem em:

- Adição de carvão ativado na entrada da água captada na estação para remover o odor e o sabor;
- Em seguida ocorre uma pré-cloração que reduz a matéria orgânica e oxida os metais presentes;
- Adição de um coagulante, que floclula as substâncias em suspensão, transformando-as em partículas maiores, para que estas possam ser removidas mais facilmente;
- Após isto a água é transferida para um tanque de decantação, onde as partículas flocluladas mais pesadas serão depositadas no fundo deste tanque;

- Em seguida a água é filtrada para remover as partículas não eliminadas no tanque de decantação;
- Adiciona-se então cal para corrigir o pH;
- E finalmente o cloro é adicionado para que ocorra a inativação de possíveis microrganismos presentes.

Abaixo se apresenta um esquema de processo de tratamento de água convencionalmente realizado nas ETA.



Fonte: www.sanasa.com.br

Figura 1 – Esquema Geral do Processo de Tratamento de Água realizado nas ETA

Uma vez que todas as impurezas tenham sido removidas um desinfetante, como o cloro, é adicionado para inibir o crescimento microbiano, pois o cloro é um dos principais agentes bactericidas e deve estar presente numa determinada concentração para que a água mantenha-se segura durante todo o trajeto de abastecimento (BRASIL, 2004). A água ao sair da ETA deve possuir a concentração de no mínimo $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, e em qualquer ponto da rede de distribuição deve ser de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ cloro livre (HAYES, 1995; BRASIL, 2004). Os resíduos de cloro livre na água são fundamentais para limitar o crescimento microbiano durante o abastecimento (van der KOOIJ et al., 1999). Entretanto, a concentração de cloro pode não ser suficiente em todos os pontos da rede, devido à distância dos pontos de cloração ou de possíveis reações com materiais orgânicos dissolvidos na água e produtos de corrosão (CHAVES, 2004).

Ainda na ETA, após todos os processos para a purificação e desinfecção da água deve ser feito um controle analítico para determinar se a água que será distribuída para a população, está livre de substâncias tóxicas e microrganismos patogênicos, para isto controles analíticos são realizados diariamente e consistem em exames químicos, físicos e microbiológicos (BRASIL,

2004). Os controles químicos visam quantificar substâncias inorgânicas, como cádmio e arsênico, substâncias orgânicas, como benzeno e acrilamida, agrotóxicos, como metolaclo e atrazina, desinfetantes e produtos secundários da desinfecção, como o cloro e pH, estas substâncias devem obedecer a concentrações máximas estabelecidas que não ofereça risco à população (BRASIL, 2004). Os controles físicos como padrão de cor e turbidez determinam a concentração de materiais em suspensão presentes e estes devem estar em níveis seguros para que não afetem a qualidade do abastecimento. Os controles microbiológicos visam detectar desde toxinas produzidas por cianobactérias, como as Cianotoxinas, protozoários como cistos de *Giardia spp*, oocistos de *Cryptosporidium sp.*, até a pesquisa de microrganismos indicadores de contaminação como os Coliformes Totais e Fecais e Contagem Total de Microrganismos Heterotróficos (PARSEKIAN, 1998; BRASIL, 2004).

A contagem de Heterotróficos em placas é usada para medir os efeitos do tratamento da água e indicar se a mesma está segura ou potável, geralmente o procedimento utilizado para isso é a aplicação de meios ricos como PCA (Plat Count Agar) ou TSA (Tryptone Soy Agar) (REASONER; GELDREICH, 1985). A contagem de Heterotróficos é muito importante por pertencerem a um grupo muito diverso com ampla capacidade metabólica e sua presença em grande quantidade apresenta sérios riscos à saúde pública, pois a maioria deles é patogênica e oportunista (BOONE; COSTENHOLZ; GARRITY, 2001). São ainda microrganismos que alteram o sabor e odor da água podendo causar muitos problemas em indústrias farmacêuticas e alimentícias (GERDREICH et al., 1972). O limite máximo estabelecido para estes microrganismos é de 500 Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC), segundo Portaria nº518 do Ministério da Saúde.

Os indicadores de contaminação fecal são utilizados para assegurar que a água está livre de patógenos entéricos e o principal indicador de contaminação fecal utilizado é a bactéria *Escherichia coli* (WILKINSON et al., 1995), sua presença indica que a água teve contato com material fecal (TORTORA; BERDELL; CASE, 2000). Segundo Pelczar, Chan e Krieg (1996), um microrganismo para ser utilizado como indicador, deve possuir as seguintes características:

- Estar presente em águas poluídas e ausentes nas não poluídas;
- Estar presente quando microrganismos patogênicos estão presentes;
- Sobreviver melhor e por mais tempo na água do que os patogênicos;
- Ser inofensivo ao homem;

- Ser facilmente detectado por testes laboratoriais rápidos.

Uma das grandes preocupações em relação aos microrganismos indicadores é se os mesmos conseguem abranger populações patogênicas de origem não fecal. Como a qualidade da água potável é determinada, basicamente, pelo número de microrganismos cultiváveis presentes, certos microrganismos como *Legionella pneumophila* e *Mycobacterium* podem não ser detectados nas técnicas baseadas em métodos cultiváveis por serem de difícil isolamento e quantificação (WILLIAMS et al., 2004; VAEREWICK et al., 2005), o que se deve ao fato de não se conseguir aplicar a mesma condição ambiental em que os mesmos se desenvolvem (HEAD; SAUNDERS; PICKUP, 1998). A desinfecção geral da população de bactérias na água em tratamento pretende eliminar patógenos específicos, mas isto não reflete a atividade real dos microrganismos no sistema (MOMBA et al., 2000).

A água tratada caracteriza-se como ambiente oligotrófico ou com baixa concentração de nutrientes (JEFFREY; XU; COWELL, 1991), algumas bactérias expostas a condições de estresse por falta de nutrientes são altamente adaptativas e utilizam vários mecanismos para sobreviver (KUZNETSOV; DUBININA; LAPTEVA, 1979; JEFFREY; XU; COWELL, 1991). Alguns estudos sugerem que na rotina dos sistemas de distribuição até mesmo membros do grupo coliformes (McFETERS; KIPPIN; LeCHAVALLIER, 1986), mas técnicas utilizadas para enumeração são consideradas básicas para demonstrar a desinfecção, o que pode não representar a realidade e serem inadequadas para demonstrar a presença de indicadores de contaminação na água potável (SEIDLER et al., 1981). Segundo LeChevallier e McFeters (1985), algumas espécies dos gêneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Sarcina*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Bacillus*, *Actinimicetos* e leveduras demonstram a associação com doenças, entretanto existe a ausência na detecção de coliformes.

Reasoner e Geldreich (1985) publicaram o desenvolvimento do meio R2A com várias fontes de carbono em baixa concentração para identificar bactérias não pertencentes ao grupo coliformes na água tratada e não detectáveis pelos métodos tradicionais de cultivo, verificando que foi possível identificar outras comunidades não detectáveis em outros meios. Bactérias oligotróficas são altamente adaptadas a ambientes pobres em nutrientes e a maioria de suas células está viáveis, mas de difícil cultivo ou até mesmo não cultiváveis (POINDEXTER, 1981; ROSZAK; COLWELL, 1987; DEFIVES et al., 1999). Utilizando as técnicas convencionais de cultivo, meios ricos, somente 1% da população oligotrófica em sistemas de água potável, pode

ser identificada, mas muitas células são capazes de crescer utilizando os nutrientes presentes no meio R2A (WARD et al., 1986; KALMBACH; MANZ; SZEWZYK, 1997), cada microrganismo depende de nutrientes específicos, em condições específicas para seu desenvolvimento (MARTIN; MacLEOD, 1984). Alguns estudos vêm sendo realizados com microrganismos oligotróficos, desde isolamento em materiais clínicos até o monitoramento de ambientes poluídos (TADA; IHMORI; YAMAGUCHI, 1995; TADA; INOL, 2000), mas a resistência a biocidas e o grau de perigo que eles podem oferecer, ainda é em grande parte, desconhecida. Através de aplicação de técnicas moleculares tem sido possível a identificação de microrganismos de ambientes naturais e conhecer a composição das comunidades não cultiváveis (SCHMALEBERGER; SCHWIEGER; TEBBE, 2001).

2.1.3 Distribuição e contaminação da água de abastecimento

A disponibilizada para o consumo da população deve obedecer às normas de qualidade, e assim permanecer durante todo tempo de estocagem e trajeto de distribuição até o consumo. A qualidade será mantida se o tratamento for adequado e se houver a constante manutenção das tubulações e reservatórios de armazenamento, sejam estes do próprio abastecimento ou residencial (CHAVES, 2004). Durante a distribuição pode ocorrer aumento no número de microrganismos e isto se dá através de células viáveis que conseguem atravessar o processo de purificação (van der WENDE; CHARACKLIS; SMITH, 1989). Existem muitos fatores que podem favorecer ao aumento da densidade microbiana, uma delas são as fontes de carbono orgânico, de fácil assimilação, que são transportados pela água desde o ponto de captação até o destino final (CHAVES, 2004). A taxa de carbono orgânico é considerada a chave para o controle do crescimento microbiano na água potável, pois na natureza o mesmo atua como suplemento para o desenvolvimento de microrganismos (MIETTINEN; VARTIALNEN; MARTIKAINEN, 1996). A estabilidade de nutrientes na água é determinada pela quantidade de carbono orgânico dissolvido, especialmente em pequenos compostos moleculares que podem ser metabolizados levando ao crescimento de células microbianas, ocasionando problemas higiênicos na água potável (BOIVIN et al., 1996; BRUCHET et al., 1991; SABY et al., 1997; ULTEE et al., 2004). Outro nutriente em grande abundância é o ferro, que é um composto necessário para o desenvolvimento celular, e está presente na composição das tubulações, A maioria dos encanamentos são de ferro, e com isso oferecem uma ótima fonte nutritiva para bactérias

favorecendo a proliferação de certos microrganismos (CARARO, 2004). A temperatura também pode influenciar muito na proliferação de coliformes no sistema de abastecimento de água (LeCHEVALLIER; BADCOCK; LEE, 1987; LeCHEVALLIER; SCHULZ; LEE, 1991). Outro fator é o de que algumas bactérias possuem mecanismos que produzem uma cápsula extracelular que ajuda na proteção contra a ação do cloro (LeCHEVALLIER; CAWTHON; LEE, 1988).

Alguns estudos demonstram a associação de bactérias resistentes a antibióticos, com bactérias que resistem as etapas de tratamento (LIPSTCH; BERGSTROM; LEVIN, 2000), esta associação é de suma importância para a saúde pública (BELL; MACRAE; ELLIOT, 1980; ARMSTRONG et al., 1981), pois é alta a frequência de fenótipos resistentes no gênero coliformes já que se associa a presença destes com a presença de gêneros causadores de doenças (FEARY; STURTEVANT; LANKFORD, 1972; SHAW; CABELL, 1980). Um estudo realizado por Abraham et al., 2007, detectaram altos níveis de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos em rios de cidades na Alemanha e em vários pontos do rio Tietê em São Paulo. Este estudo demonstra um fato preocupante, que a composição microbiana dos rios é altamente resistente a ambientes instáveis e também a compostos antimicrobianos.

Muitos dos microrganismos que conseguem sobreviver ao pós-tratamento podem viver em comunidades na forma de biofilmes. Biofilme é uma matriz polimérica de aspecto gelatinoso, que se adere a uma superfície sólida, imersa em meio líquido, e é constituído essencialmente de microrganismos (CHAVES, 2004). Estes biofilmes se formam com uma relativa facilidade, pois, os microrganismos que o desenvolvem, requerem condições mínimas de nutrientes no meio. Sob esta forma uma comunidade diversa de microrganismos é formada (MOMBA et al., 1998). Os mais encontrados são: microalgas, fungos, protozoários, bactérias e vírus (ALEGRE, 1994). Muitos biofilmes, encontrados nas redes de distribuição e em caixas de armazenamento de água potável, são pouco espessos e não cobrem inteiramente a superfície, podendo causar a biocorrosão dos canos e consumir todo o cloro residual, porque também agregam materiais orgânicos, produzem metabólitos que geram odor e sabor, e principalmente podem causar a contaminação da água potável (WALKER; KEEVIL, 1994; SERVAIS et al., 1992). Crescer sob formas de biofilme na água potável é uma das grandes vantagens que os microrganismos possuem, pois bactérias nos biofilmes têm maior resistência contra agentes desinfetantes como o cloro, e esta resistência se devem a matriz polimérica do biofilme, que restringe a difusão de agentes microbianos (MORIN et al., 1996; HOYLE; JASS; COSTERTON, 1990; SCHWARTZ;

HOFFMANN; OBST, 2003). Estes também são muito comuns em sistemas de irrigação, causando diversos problemas, como o entupimento dos bicos de irrigação, diminuindo a capacidade de transporte de água e ainda podendo contaminar a lavoura pelo desprendimento de porções do biofilme (CARARO, 2004). Segundo Rezende, 1999, o entupimento dos bicos de irrigação está diretamente relacionado com a qualidade da água utilizada, e muitos microrganismos ainda permanecem na água mesmo após a passagem pelo filtro de areia.

Para detectar possíveis pontos de contaminação no sistema de tratamento, é necessário conhecer quais são e o que ocorre com os microrganismos que se veiculam na água tratada durante todo o processo de tratamento e distribuição (SZEWZYK et al., 2000). É importante identificar como os patógenos são conduzidos a diferentes lugares e qual habitat requer, para assim se conhecer o grau de perigo que os mesmos oferecem e como a contaminação pode ser controlada (ABRAHAM et al., 2007).

2.1.4 Técnicas moleculares para identificação de microrganismos

Muitas técnicas moleculares têm servido como ótimas ferramentas no estudo da estrutura e diversidade microbiana, onde se utiliza o DNA genômico extraído diretamente das amostras, permitindo assim grandes avanços no estudo da ecologia microbiana (VAUGHAN et al., 2001). As análises de DNA fornecem informações sobre comunidades microbianas independentes de cultivo, e algumas destas análises envolvem o sequenciamento de genes rDNA 16S e estratégias baseadas em reações de PCR como DGGE e SSCP (CASES; LORENZO, 2002). Estudos recentes demonstram que a identificação através de métodos moleculares utilizando o sequenciamento do rDNA 16S são mais completos que testes bioquímicos convencionais (SINGH; STINE; SMITH, 2003; MUYZER; WAAL; UITTERLINDEN, 1993). Com os testes, numerosos isolados permaneciam sem identificação precisa, mesmo depois da aplicação de todos os testes fenotípicos, agora, com o uso do rDNA 16S, a pesquisa molecular tem sido extensivamente usada para a filogenia de microrganismos, levando ao estabelecimento de um grande banco de dados de domínio público (WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990; WEISBURG et al., 1991; DRANCOURT et al., 2000).

A estrutura do rDNA é relativamente conservada, comparado com outros genes que possuem uma taxa de mutação baixa durante a evolução, portanto a partir do rDNA de uma espécie de organismo pode-se obter informações filogenéticas (ABREU, 2004). Os ribossomos

são constituídos por duas subunidades, e cada uma destas integra moléculas de rDNA de diferentes tamanhos. Nos procariotos encontramos moléculas 5S, 23S e 16S, as quais são regiões altamente conservadas e armazenam informações que permitem comparações entre organismos (ALBERTS et al., 1997). As regiões conservadas são muito semelhantes entre diferentes microrganismos, contudo dentro destas existem pequenas seqüências que são únicas para um determinado microrganismo em particular (WHELLER et al., 1996). Com isso é possível comparar a seqüência do rDNA 16S de diferentes bactérias, e esta pode ser comparada com outras seqüências e assim determinar a sua taxonomia (WOESE, 1987). Estas seqüências fornecem a “impressão digital” molecular de um determinado organismo, pois são nucleotídeos únicos que podem ser utilizados para a identificação individual de células microbianas (AMANN; LUDWIG; SHELEIFER, 1995; AMANN et al., 1996 HÖFLE et al., 2005).

Os métodos moleculares têm sido principalmente usados para determinar a composição de comunidades microbianas independentes de cultivo. O Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), utiliza géis de acrilamida contendo gradiente desnaturante, como uréia e formamida. Onde moléculas de DNA com tamanhos semelhantes, mas com seqüências de nucleotídeos diferentes, o conteúdo de G+C de um fragmento definirá a posição de desnaturação (LORENZI, 2004). As análises de DGGE são consideradas confiáveis e rápidas, pois permitem a análise simultânea de amostras facilitando, assim o estudo de comunidades. Contudo, a técnica possui várias limitações, as principais estão ligadas á extração do DNA, onde a mesma deve obter um DNA de boa qualidade; a outra esta relacionada ao PCR, o primer utilizado é muito grande, possui um grampo G+C e durante o passo de anelamento no PCR, podem ocorrer altas taxas de amplificação inespecífica dificultando a identificação de bandas isoladas no gel (BOND et al., 1995; BRITSCHGI; GIOVANNONI, 1991; LEE; ZO; KIM, 1996; DORIGO; VOLATIER; HUMBERT, 2005). Outro problema encontrado é a sobreposição de bandas que ocorre devido às características de mobilidades similares entre as espécies, ou à presença de uma única espécie, mas com pequenas diferenças na composição de bases nitrogenadas fazendo com que várias bandas sejam geradas de um mesmo microrganismo (DORIGO; VOLATIER; HUMBERT, 2005).

Outro procedimento também baseado em PCR utilizado para a análise de comunidades microbianas não cultiváveis, o Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) foi primeiramente usado por Orita et al., 1989, para detecção de polimorfismo e mutação em genes

humanos. Em condições desnaturantes, a fita simples de DNA tem uma estrutura dobrada que é determinada por interações intramoleculares da seqüência de nucleotídeos. Segundo Orita et al., 1989 a mobilidade não é somente pelo polimorfismo da fita simples, mas também por mudanças conformacionais designados por fatores de SSCP dos DNAs, isto demonstra que esta técnica pode ser utilizada para estudos de famílias e espécies. A mobilidade eletroforética do DNA no gel de poliacrilamida, não depende somente do comprimento e do peso molecular, mas também pela estrutura formada após a denaturação da fita. Portanto, a análise de SSCP, com fragmentos de DNA com mesmo tamanho, mas com seqüências diferentes, podem ser separados para diferentes bandas no gel, devido à diferença de mobilidade da estrutura dobrada determinada para cada espécie (SCHMALENBERGER; TEBBE, 2003; DORIGO; VOLATIER; HUMBERT, 2005).

O uso da técnica do SSCP, para identificação de espécies microbianas, foi descrito por Lee, Zo e Kim (1996), eles a descrevem como um novo método para estudo da estrutura e diversidade de comunidades microbianas em ecossistemas aquáticos. E que a mesma além de consumir pouco tempo de trabalho, comparado com outras técnicas, é possível se obter um resultado rápido e detalhado através da amplificação e sequenciamento das bandas retiradas do gel. Apesar da técnica de SSCP possuir algumas limitações, como um reanelamento da fita de DNA após a denaturação inicial durante a eletroforese e o aparecimento de mais de uma banda para cada microrganismo, é muito efetiva nas análises de comunidades com alta diversidade microbiana, porque a taxa de amplificação inespecífica é menor (SCHWEGER; TEBBE, 1998; SELVAKUMA; DING; WILSON, 1996). Em comparação com o DGGE, o SSCP foi utilizado por Peters et al., 2000, para identificar a comunidade microbiana da rizosfera de diferentes plantas, o SSCP indicou um alto potencial na monitoração destas comunidades, diminuindo a informação redundante no sequenciamento das bandas isoladas.

Um estudo realizado por Eichler et al., 2006, teve como objetivo conhecer a estrutura e composição de comunidades microbianas em sistemas armazenamento de água potável, os quais eram interligados, utilizando a amplificação da região 16S e também o SSCP, foram seqüenciadas 216 bandas e encontrou-se grupos taxonômicos típicos de água potável, como *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Actinobacteria*, com $\geq 98\%$ de similaridade. Os resultados obtidos revelaram que a microbiota presentes nos reservatórios são diferentes, demonstrando que pode ocorrer um aparecimento de microrganismos ao longo de sistemas de distribuição.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Área do estudo

A área de estudo localiza-se na cidade de Piracicaba - SP, e as análises realizadas foram a partir das águas tratadas na Estação de Tratamento de Água ETA 3 – Capim Fino. Esta estação de tratamento abastece cerca 90% da cidade de Piracicaba, a adutora principal que sai da ETA 3 abastece 4 principais reservatórios de distribuição localizados nos bairros: Vila Rezende, Bairro dos Alemães, Santa Terezinha e Parque Piracicaba, onde a partir destes, outros 8 reservatórios são abastecidos: Santa Rosa, Unileste, Recanto Tropical, Dois Córregos, Agronomia, Centro, CECAP, Boa Esperança, Santana e Santa Olímpia. Os bairros foram distribuídos em três grandes regiões:

- Região Leste: Santa Terezinha, Parque Piracicaba, Boa Esperança, Santana e Santa Olímpia;
- Região Oeste: Vila Rezende e Santa Rosa;
- Região Central: Bairros dos Alemães, Unileste, Recanto Tropical, Dois Córregos, Agronomia, CECAP e Centro.

As amostras foram coletadas em pontos estratégicos antes e após o tratamento, ao longo da linha de distribuição também em reservatórios residenciais . A Figura 2, mostra os pontos amostrados dentro da ETA 3 e também ilustra as amostragens durante a distribuição.



Figura 2 – Pontos amostrados no ETA 3 e na rede de distribuição, sendo (1) Captação de água; (2) Entrada dos reservatórios no ETA 3; (3) Saída dos reservatórios do ETA 3; (4) Entrada do reservatório de distribuição; (5) Saída do reservatório de distribuição; (6 a 10) Amostragens nos pontos de consumo (residências)

A escolha das residências obedeceu a faixa de 1000 metros sempre a partir da estação de bombeamento respectiva, com exceção das três residências escolhidas em cada região que

obedeceu a faixa de 1500 a 2500 metros a partir do ETA 3, o objetivo da coleta nestas três residências foi analisar a qualidade da água exatamente na metade do trajeto percorrido antes de chegar na primeira estação de bombeamento de cada região. Para uma maior facilidade na compreensão dos dados as amostras Residenciais e das Estações de Bombeamento foram numeradas e chamadas de **R** e **EB** respectivamente. As Tabelas 1 e 2 mostram as distâncias em metros de cada residência e estação de bombeamento a partir do ETA 3, e suas respectivas identificações e regiões. As amostras foram coletadas diretamente das torneiras de entrada, ou seja, a água de distribuição (cavalete) que chega até a residência ou estação de bombeamento, esta será chamada de **Água da Distribuição**, e também da água armazenada nas caixas d'água dos mesmos, que será chamada de **Água Armazenada**. Contudo algumas estações de bombeamento, como 01, 02, 03, 08, 11 e 13 a coleta na entrada não foi possível porque a adutora principal esta ligada diretamente ao reservatório destas estações, portanto não existe torneira disponível para a coleta. A amostra EB 2 não possui dado na primeira coleta porque não foi possível efetuá-la devido a alta vazão de água no dia amostragem.

Tabela 1 - Localização e identificação das residências abastecidas pelo ETA 3

Residências	Distância do Abastecimento a partir do ETA 3 (m)	Região
01	4.800	Leste
02	6.625	Leste
03	7.820	Leste
04	18.840	Leste
05	27.676 (norte)	Leste
06	27.676 (sul)	Leste
07	3.100	Oeste
08	6.825	Oeste
09	8.600	Central
10	10.750	Central
11	11.795	Central
12	12.505	Central
13	15.145	Central
14	17.148	Central
15	19.960	Central

Tabela 2 - Localização e identificação das estações de bombeamento abastecidas pelo ETA3

Estações de Bombeamento	Distância do Abastecimento a partir do ETA 3 (m)	Região
01	5.625	Leste
02	6.820	Leste
03	17.840	Leste
04	25.431	Leste
05	27.176	Leste
06	5.825	Oeste
07	9.750	Central
08	10.795	Central
09	11.070	Central
10	12.005	Central
11	13.365	Central
12	16.145	Central
13	18.960	Central

2.2.2 Plano de amostragem

As coletas foram agendadas procurando selecionar os períodos de estiagem e de chuva, sendo assim a primeira coleta foi realizada no dia 19 de Julho de 2006 e a segunda coleta no dia 27 de Fevereiro de 2007. Nas duas coletas contou-se com a presença de um coletor especializado cedido pelo Serviço Municipal de Água e Esgoto de Piracicaba - SEMAE.

Para as análises microbiológicas convencionais, as amostras foram coletadas em frascos com 500ml, previamente autoclavados contendo 0,5% de tiosulfato de sódio para neutralizar a ação do cloro. E para as análises moleculares os frascos também foram autoclavados e em seguida adicionou-se Formaldeído na concentração de 2%, pois este age como um conservante do material genético. Todas as amostras foram conservadas a temperatura de 5° C até a chegada ao laboratório e analisadas imediatamente.

2.2.3 Meios de cultura, soluções, tampões e géis

Caldo PA (Presença/Ausência)

Extrato de carne	3,0g
Peptona	5,0g
Lactose	7,46g
Triptona	9,83g
Fosfato Dipotássico Hidrogenado	1,35g
Fosfato Monopotássico Dihidrogenado	1,35g

Cloreto de Sódio	2,46g
Lauryl Sulfato de Sódio	0,05g
Púrpura de Bromocresol	0,0085g
Água Deionizada	1000mL

*Este meio deve ser preparado na concentração tripla para análises de água de 100mL (APHA, 2005)

Esterilizado por autoclavagem a 1 atm por 20 minutos

Caldo Verde Brilhante MUG (VB-MUG)

Peptona	10,0g
Lactose	10,0g
Oxgall	20,0g
4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronide	0,05g
Verde Brilhante	0,0133g
Água Deionizada	1000mL

Esterilizado por autoclavagem a 1 atm por 20 minutos

Caldo EC

Triptona	20,0g
Lactose	5,0g
Sais de Bile nº3	1,5g
Fosfato Dipotássico Hidrogenado	4,0g
Fosfato Monopotássico Dihidrogenado	1,5g
Cloreto de Sódio	5,0g
Água Deionizada	1000mL

Esterilizado por autoclavagem a 1 atm por 20 minutos

Meio Triptona Soja Agar (TSA)

Triptona	15,0g
Peptona de Soja	5,0g
Cloreto de Sódio	5,0g

Agar	15,0g
Água Deionizada	1000mL

Esterilizado por autoclavagem a 1 atm por 20 minutos

Meio R2A (baixa concentração de nutrientes)

Extrato de Levedura	0,5g
Proteose Peptona	0,5g
Glicose	0,5g
Amido Solúvel	0,5g
Fosfato Dipotássico Hidrogenado	0,3g
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	0,05g
Piruvato de Sódio	0,3g
Agar	15,0g
Água Deionizada	1000mL

Esterilizado por autoclavagem a 1 atm por 20 minutos

Solução I

Tris – 25mM	30,28g
EDTA – 10mM	37,72g
Água Deionizada	1000mL

* O pH foi acertado para 8,0

Esterilizado por autoclavagem a 1 atm por 20 minutos

Solução II

SDS 10%

NaOH 4N

Esterilizado por autoclavagem a 1 atm por 20 minutos

* Estas soluções devem ser preparadas em separado e no momento do uso deve-se adicionar 0,5mL de cada em 9mL de água deionizada estéril.

Clorofil

Álcool Metílico	1,0mL
Clorofórmio	24,0mL

Tampão de Denaturação

NaOH	10mM
Azul de Bromofenol	0,0025%
Xileno Cianol	0,0025%
Formamida	95%

Tampão Tris-Borato-EDTA

Tris	89mM
Ácido Bórico	89mM
EDTA	20mM

Água de Diluição

Fosfato de Potássio Dihidrogenado	0,068%
Cloreto de Magnésio	0,081%

Gel de Poliacrilamida 18%

Acrilamida – Bis	18%
TBE	10X
TEMED	0,04%
Persulfato de Amônio	10%

2.2.4 Métodos analíticos para as análises microbiológicas

As amostras foram submetidas a testes microbiológicos convencionais para determinar a potabilidade segundo a Portaria nº518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde e os procedimentos analíticos segundo APHA, 2005.

2.2.4.1 Pesquisa de coliformes totais e fecais:

- Adicionou-se 100mL de cada amostra em erlenmeyers de 250mL contendo 50mL de caldo P.A na concentração tripla e em seguida incubadas á 37° C por 48 horas;
- As amostras que apresentaram produção de gás e viragem do indicador para o amarelo foram consideradas positivas para o teste presuntivo;
- Transferiu-se 10µL de cada amostra positiva em tubos contendo 5mL de caldo VB-MUG, para confirmação de coliformes totais, e tubo de Duhran invertido, incubou-se á 37° C por 48 horas;
- As amostras positivas (com produção de gás e fluorescência sob UV), foram transferidas, também com 10µL, para tubos contendo 5mL de caldo EC, para confirmação de coliformes termotolerantes, e tubo de Duhran invertido, incubou-se em banho-maria a 44,5° C por 48 horas;
- A partir das amostras positivas no caldo EC (produção de gás) procedeu-se com os testes bioquímicos tradicionais para confirmação da presença de *Escherichia coli*;
- Os tubos positivos foram semeados com alça de platina em placas contendo o meio EMB (Eosina Azul de Metileno) e incubados á 37° C por 48 horas;
- As colônias isoladas e positivas (coloração rósea com ou sem halo de precipitação e verdes metálicas) foram transferidas simultaneamente para a bateria bioquímica INVIC (Citrado de Simmnons, Teste do Indol e Teste VM-VP).

2.2.4.2 Contagem de microrganismos mesófilos estritos e facultativos viáveis:

- Foram plaqueados 1,0mL e 0,1mL de cada amostra e em seguida adicionados aproximadamente 20ml do meio TSA, incubou-se à 37° C por 48 horas.
- Após o período de incubação e contagem, selecionou-se diferentes colônias, através da morfologia para a identificação através da amplificação da região 16S rDNA.

2.2.4.3 Contagem de microrganismos oligotróficos:

- Foram plaqueados 1,0mL e 0,1mL de cada amostra e adicionou-se aproximadamente 20mL do meio R2A, que possui uma baixa concentração de nutrientes na sua composição, beneficiando-se assim o crescimento de comunidades oligotróficas (CHAVES, 2004).

- Após o período de incubação e contagem, selecionou-se diferentes colônias, através da morfologia para a identificação através da amplificação da região 16S rDNA.

2.2.5 Análise molecular através da região 16S rDNA:

2.2.5.1 Extração do DNA das colônias isoladas:

- As colônias selecionadas foram crescidas em meios líquidos, mesmos do isolamento;
- Incubou-se por 48 horas;
- Tomou-se 1mL de cada amostra centrifugou-se até a obtenção de pellet;
- Adicionou-se 100 μ L de Solução I e ressuspendeu-se o pellet;
- Em seguida adicionou-se 200 μ L de Solução II;
- Incubaram-se as amostras em gelo por 1 hora;
- Adicionou-se 2 volumes de Clorofil;
- Após cuidadosa agitação foram centrifugados a 13000rpm por 10 minutos;
- Retirou-se o sobrenadante transferiu-se para um novo eppendorf;
- Adicionou-se 2 volumes de Álcool Etanol PA gelado para a precipitação;
- Os tubos foram centrifugados por 10 segundos a 13rpm;
- Após a secagem as amostras foram ressuspendidas em 50 μ L de água deionizada esterelizada;
- A integridade do DNA foi verificada aplicando-se 10 μ l em gel de agarose 1% com brometo de etídio, à 90mV por 1 hora;

2.2.5.2 Extração do DNA diretamente da água:

- Filtrou-se 100mL de cada amostra através do sistema de membrana filtrante de vidro previamente autoclavado. A membrana utilizada foi da marca Millipore de 0,22 μ m;
- A cada troca de amostra o sistema de filtração foi lavado com água de diluição segundo APHA, 2005; para assim garantir que não houvesse contaminação de uma amostra para outra;
- Após a filtração cada membrana foi colocada em tubos Falcon de 15mL;
- Foram adicionados 2mL de Solução I e colocado sob agitação inclinada por 10 minutos em temperatura ambiente;

- Em seguida foram adicionados 4mL da Solução II e novamente colocados sob agitação inclinada por 10 minutos em temperatura ambiente;
- O volume total obtido nos tubos foi dividido em eppendorfs com 0,5mL cada para a desproteinização;
- Adicionou-se 1,0mL de Clorofil;
- Após agitação foram centrifugados a 13000rpm por 10 minutos;
- Retirou-se o sobrenadante transferiu-se para um novo eppendorf;
- Adicionou-se 2 volumes de Álcool Etanol PA gelado para a precipitação;
- Os tubos foram centrifugados por 10 segundos a 13000rpm;
- Após a secagem as amostras foram ressuspensas em 50 μ L de água deionizada esterelizada;
- A integridade do DNA foi verificada aplicando-se 10 μ L em gel de agarose 1% com brometo de etídio, à 90mV por 1 hora.

2.2.5.3 Amplificação dos DNAs obtidos a partir dos dois métodos de extração:

- A amplificação da região rDNA 16S foi realizada em solução contendo:
- 5,0 Mm de Tampão para PCR;
- 3,0 Mm de MgCl₂;
- 1,0 U de Taq DNA Polimerase;
- 1,0 Mm de DNTP;
- 20,0 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores: F530 (GTGCCAGCMGCCGCGG) e R922 (CCGCCTTGTGCGGGCCCCCGTC);
- Água deionizada esterelizada para um volume final de 50 μ L.
- O termociclador utilizado foi PTC- 100 MJ – Research, nas seguintes condições: 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e uma extensão final de 10 minutos a 72°C.
- O tamanho do fragmento esperado foi de 390pb.

2.2.5.4 Preparação da fita simples de DNA, do sistema de eletroforese e coloração do gel:

- Para a denaturação das amostras e obtenção da fita simples tomou-se 25µL de cada amostra e adicionou-se 25µL do tampão de denaturação;
- Esta mistura foi incubada a 95°C por 20 minutos
- Terminado este tempo foi imediatamente incubada em banho de gelo por aproximadamente 5 minutos;
- O gel de poliacrilamida 18% foi preparado nas seguintes medidas: 18cm de largura, 16cm de comprimento e 1mm de espessura;
- Após a polimerização o gel foi colocado sob voltagem em tampão TBE 1X para a pré – corrida antes do carregamento das amostras, para a limpeza do mesmo;
- O tempo da pré-corrida foi de 3 horas à 150 V;
- Após este tempo todo o volume da mistura amostra/tampão de denaturação (aproximadamente 50µL) foi carregado no gel de poliacrilamida;
- O tempo de corrida foi padronizado para 24 horas à 77 V;
- Para a coloração do gel utilizou-se o método para prata segundo GOMES, 2000

2.2.5.5 Análise das bandas, isolamento e amplificação dos fragmentos de DNA a partir do gel de SSCP:

- Após a revelação os géis foram digitalizados pelo Software Kodak Digital Science 1D Image Analysis;
- Somente as bandas com intensidade acima da média geral de pixels, gerada pelo próprio software foram selecionadas;
- Com a ajuda de um bisturi, as bandas selecionadas foram cuidadosamente retiradas do gel e transferidas para um eppendorf contendo 20 µL de água deionizada esterelizada e 20µg de Glass Bides;
- Neste, as bandas foram maceradas com o auxílio de um pistilo de plástico até a obtenção de uma mistura homogênea;
- Para o PCR utilizou-se 5µL desta mistura;
- Os primers e os procedimentos para a reação de reamplificação foram os mesmos citados no item 3.5.2;

2.2.5.6 Purificação e quantificação dos produtos de PCR para a reação de sequenciamento:

As amostras encaminhadas para o sequenciamento foram todos os isolados selecionados dos meios de cultivo em placa e também os produtos das reamplificações das bandas retiradas do gel de poliacrilamida;

- Adicionou-se 2 volumes de Isopropanol 65% gelado;
- Homogeneizados e centrifugados a 13000rpm por 3 minutos;
- Cuidadosamente desprezou-se o sobrenadante;
- Em seguida foram adicionados 2 volumes de Etanol 70% gelado;
- Também homogeneizados e centrifugados a 13000rpm por 3 minutos;
- Desprezou-se o sobrenadante;
- Após a secagem as amostras foram ressuspensas em 30 μ L de água deionizada esterelizada;
- A quantidade de DNA foi determinada por espectrofotômetro, segundo Maniatis et al., 1982

2.2.5.7 Sequenciamento e análises das seqüências:

- Para a reação de sequenciamento foi utilizado 1 μ L (aproximadamente 100ng de DNA) dos produtos previamente amplificados, como citado acima;
- O primer utilizado para a reação foi o F530;
- O sequenciamento foi realizado utilizando o protocolo padrão do Kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing (Amersham Biosciences);
- O seqüenciador utilizado foi o ABI-3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA. USA).
- Os cromatogramas obtidos foram examinados para verificação da qualidade utilizando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor;
- As seqüências obtidas foram comparadas com as seqüências depositadas no banco de dados publico Genbank do NCBI.

2.3 Resultados e Discussão

O fato de vários problemas de saúde estarem sendo mundialmente associados ao suprimento público de água, tem-se exigido um controle de qualidade cada vez mais rigoroso, principalmente em relação às amostragens e o uso de recursos analíticos mais sofisticados para identificar agentes perigosos a saúde. Neste trabalho procurou-se identificar não somente espécies bacterianas que possam comprometer a qualidade da água de consumo, mas também novos métodos analíticos e de amostragens que possam revelar a real situação da qualidade da água de abastecimento, conforme as descrições a seguir.

2.3.1 Análises da concentração de cloro livre

Para a desinfecção e manutenção da qualidade da água potável um agente bactericida é adicionado, o cloro é um dos principais agentes utilizados e deve estar presente para que a água mantenha-se segura e livre de microrganismos patogênicos durante todo o abastecimento (CRUMP et al., 2004). Segundo a Portaria nº 518 do Ministério da Saúde a concentração de cloro livre na água deve estar na faixa de 0,2 a 2,0 mg.L⁻¹ em qualquer ponto da rede de distribuição. Para avaliar esta condição realizaram-se análises em todas as amostras no momento da coleta, através do método colorimétrico, por um funcionário especializado do SEMAE – Piracicaba, que acompanhou todos os procedimentos de coleta das amostras.

A avaliação das amostras coletadas nas estações de bombeamento constatou que todas as amostras de entrada e armazenadas, apresentaram resultado dentro do limite exigido, conforme mostra a Tabela 3. Segundo o SEMAE – Piracicaba em todas as estações de bombeamento da cidade existe um controle na dosagem de cloro onde se o mesmo estiver abaixo do limite este é imediatamente adicionado para que a concentração seja mantida no abastecimento das residências ao redor. A análise de significância realizada nas variações dos teores de cloro obtidos na água de distribuição e da água armazenada revelou que apesar de existirem variações, a médias dos resultados não foi significativo aos níveis de 1% e 5% no Teste F (GOMES, 2000), como demonstrado na Tabela 4.

Tabela 3 - Variação da concentração de cloro livre nas estações de bombeamento

Estações de Bombeamento	Primeira Coleta			Segunda Coleta		
	Distribuição	Armazenada	% redução	Distribuição	Armazenada	% redução
01	-	2,0	-	-	1,43	-
02	-	-	-	-	1,23	-
03	-	1,5	-	-	1,0	-
04	1,0	1,0	0	1,26	1,0	20
05	1,0	0,7	30	1,3	1,12	13
06	2,0	1,5	25	0,9	0,8	11
07	1,5	1,5	0	1,5	1,5	0
08	-	1,5	-	-	1,5	-
09	1,5	1,5	0	1,0	0,93	7
10	1,5	1,5	0	1,5	1,25	16
11	-	1,5	-	-	1,3	-
12	1,5	1,5	0	1,0	0,8	20
13	-	2,0	-	-	1,2	-

Tabela 4 – Teste de significância entre as concentrações de cloro da água de distribuição e da armazenada nas estações de bombeamento

	Primeira coleta		Segunda coleta	
	Distribuição	Armazenada	Distribuição	Armazenada
Média	0,769231	1,361538	0,650769	1,158462
Variância	0,608974	0,282564	0,423508	0,058597
Observações	13	13	13	13
GL	12	12	12	12
f	2,155172		7,22741	
F crítico	2,686637		2,686637	
F<f	0,09897		0,000862	

Tabela 5 - Variação da concentração de cloro nas residências

Residências	Primeira Coleta			Segunda Coleta		
	Distribuição	Armazenada	% redução	Distribuição	Armazenada	% redução
01	2,0	0,9	55	1,23	0,4	67
02	2,0	0,5	75	1,35	1,03	23
03	1,5	0,4	73	1,0	0	100
04	1,5	0,8	46	1,2	0,7	41
05	0,7	0,1	85	1,29	0,4	68
06	0,6	-	-	1,0	-	-
07	1,5	0,5	66	0,9	0,2	77
08	2,0	0,0	100	1,13	0,1	91
09	1,5	1,5	0	2,0	0,2	90
10	1,5	1,0	33	1,17	0,2	82
11	2,0	0,05	97	1,2	0	100
12	2,0	1,0	50	1,3	0	100
13	1,5	1,0	33	1,0	0,9	10
14	1,5	1,0	33	1,0	1,0	0

Tabela 6 - Tabela 4 – Teste de significância entre as concentrações de cloro da água de distribuição e da armazenada nas residências

	Primeira coleta		Segunda coleta	
	Distribuição	Armazenada	Distribuição	Armazenada
Média	1,557143	0,625	1,197857	0,366429
Variância	0,204176	0,223365	0,072095	0,148548
Observações	14	14	14	14
GL	13	13	13	13
f	0,914089		0,485332	
F crítico	0,388059		0,388059	
F<f	0,436901		0,102898	

O teor de cloro encontrado em amostras residenciais, conforme Tabela 5, demonstra que a água quando chega à residência possui a concentração de cloro dentro da faixa exigida, contudo em três residências na primeira coleta e em quatro na segunda, a concentração de cloro da água armazenada apresenta resultado abaixo do limite mínimo exigido. Nas residências 5 e 8 este resultado se repete nas duas coletas, nestas os moradores informaram que a caixa d' água não era limpa a muito tempo e também foi observada a presença de filtro de carvão ativado na entrada da água de distribuição na residência, mesmo que algumas residências tenham apresentado o resultado dentro do limite exigido, pode-se observar que existe a redução da concentração de cloro quando a água está sendo armazenada no domicílio. Na análise de significância aplicada nos resultados obtidos nas concentrações de cloro revelou que na média a variação é significativa aos níveis de 1% e 5% no Teste F (GOMES, 2000), como demonstrado na Tabela 6.

O fato principal constatado durante as coletas é o de que a maioria dos moradores informou desconhecer a necessidade de limpeza das caixas de armazenamento. A falta de manutenção nos reservatórios residenciais pode ter contribuído para a redução na concentração de cloro, e no caso de alguns domicílios, a presença de filtro de carvão ativado na entrada da água potável também. Uma avaliação realizada por D'Aguila et al. (2000) demonstra que a água distribuída no município de Nova Iguaçu - RJ, não possui a mesma concentração de cloro da água armazenada na residência, e também sugerem que principal causa seria a falta de manutenção nos reservatórios. Segundo van der Kooij et al. (1999), os resíduos de cloro livre na água são fundamentais para inibir o crescimento microbiano durante o abastecimento ou armazenamento da água tratada. A limpeza periódica principalmente nos reservatórios residenciais é muito importante para assegurar a qualidade da água consumida pelo morador, pois a presença de matéria orgânica, o acúmulo de poeira, insetos mortos, consomem todo o cloro livre

comprometendo a sua ação bactericida. Os Sistemas de Abastecimento de Água, não só da cidade de Piracicaba, analisam neste caso, a concentração de cloro, somente na entrada da água de distribuição na residência, não avaliando a água exatamente no ponto de consumo, não havendo o controle da água verdadeiramente consumida. Mas se as amostragens fossem estendidas até as torneiras internas das residências haveria dados mais amplos em relação à água consumida, demonstrando o perigo e assim conscientizando a população da importância da limpeza nas caixas de armazenamento de água.

A presença de compostos na água clorada pode resultar na formação de compostos como trihalometanos, que são considerados altamente prejudiciais a saúde, os filtros de carvão ativado contribuem para a redução de compostos na água de consumo, mas ao mesmo tempo eliminam consideravelmente a concentração de cloro (MEYER, 1994). Diante deste fato o uso destes filtros ajuda na manutenção da qualidade da água no ato do consumo, mas dependendo de sua localização na residência, pode comprometer a qualidade da água que ficara armazenada, sendo assim o ideal seria que os filtros de carvão ativado, fossem posicionados na saída do armazenamento do domicílio, ao invés da entrada da água na residência, como foi constatado, para assim ter uma ação mais efetiva não comprometendo a qualidade da água a ser consumida pelo morador.

2.3.2 Análises para a determinação da potabilidade

Os controles bacteriológicos para determinação da potabilidade da água exigidos pela Portaria nº 518 do Ministério da Saúde, consistem em Pesquisa de Coliformes Totais e Termotolerantes em 100 mL de água (Ausência em 100mL) e Contagem Total de Microrganismos Heterotróficos por mL ($<500\text{UFC/mL}$), se os resultados obtidos estiverem dentro dos limites máximos estabelecidos, segundo a mesma portaria, água é considerada própria para o consumo humano, ou que a água está livre de microrganismos patogênicos, portanto analisar todos os pontos de coleta seria de grande importância para avaliar se a água que sai da ETA 3 se mantém dentro dos padrões de qualidade até mesmo nos pontos mais distantes.

As Tabelas 7 e 8 mostram os resultados nas análises microbiológicas obtidos a partir das amostras coletadas na ETA 3, nestas podemos observar que após os processos de tratamento da água, há uma redução na contaminação microbiológica, pois a água de captação antes de ser tratada apresentou resultado médio, das duas coletas, superior a $3,3 \times 10^4$ UFC/mL para o

parâmetro de contagem total de microrganismos heterotróficos e resultados positivos nas pesquisas de coliformes totais e termotolerantes, ao passar pelas etapas de purificação a média contagem foi reduzida para 3,0 UFC/mL e resultado negativo para a pesquisa de coliformes totais e termotolerantes. Após a água passar pelos métodos convencionais de tratamento não deve apresentar risco para a saúde pública, pois este elimina boa parte da carga microbiana presente e também substâncias químicas tóxicas, possivelmente presentes na água captada no manancial (PAKERSIAN, 1998; SANTOS, 2007). Frente aos resultados obtidos através dos exames microbiológicos convencionais aplicados para a determinação da potabilidade da água, segundo a Portaria nº 518 do Ministério da Saúde, a água distribuída, a partir do ETA 3, neste período estava dentro dos limites exigidos apresentando-se própria para distribuição e consumo.

Tabela 7 – Resultados obtidos nas amostras coletadas na ETA 3 na primeira coleta

Pontos de Coleta	Coliformes Totais em 100 mL	Coliformes Termotolerantes em 100 mL	Contagem Total de Heterotróficos UFC/mL
Água Captada para tratamento	Presença	Presença	$1,7 \times 10^{-3}$
Pós tratamento - entrada reservatório	Ausência	Ausência	3,0
Saída reservatório - distribuição	Ausência	Ausência	<1,0

<1,0 – Limite de Detecção do Método; UFC – Unidades Formadoras de Colônias.

Tabela 8 – Resultados obtidos nas amostras coletadas na ETA 3 na segunda coleta

Pontos de Coleta	Coliformes Totais em 100 mL	Coliformes Termotolerantes em 100 mL	Contagem Total de Heterotróficos UFC/mL
Água Captada para tratamento	Presença	Presença	$6,5 \times 10^{-4}$
Pós tratamento - entrada reservatório	Ausência	Ausência	3,0
Saída reservatório - distribuição	Ausência	Ausência	<1,0

<1,0 – Limite de Detecção do Método; UFC – Unidades Formadoras de Colônias.

As amostras coletadas em todo sistema de distribuição na Primeira coleta apresentaram resultado satisfatório quanto a Contagem Total de Microrganismos Heterotróficos, conforme as

Tabelas 9, 10, 11 e 12, e Coliformes Termotolerantes. Contudo algumas amostras, relacionadas abaixo, apresentaram resultado positivo na pesquisa de coliformes totais.

- R 04 – Distribuição;
- R 06 – Distribuição;
- R 07 – Armazenada;
- R 10 – Distribuição;
- R 11 – Armazenada;
- R 13 – Armazenada;
- EB 06 – Armazenada;
- EB 11 – Armazenada.

Nas amostras da segunda coleta somente uma amostra residencial, R 08 – armazenada, apresentou resultado positivo para a pesquisa de coliformes totais, mas todas as amostras, tanto para Residências (distribuição/armazenada) como para Estações de Bombeamento (distribuição/armazenada), apresentaram resultado dentro do limite para a Contagem de Microrganismos Heterotróficos e Coliformes Termotolerantes. Segundo o Ministério da Saúde, todas as amostras devem apresentar resultados negativos na pesquisa de coliformes termotolerantes, contudo para coliformes totais o valor máximo permitido (VMP) 5% no total da amostragem podem apresentar resultados positivos, para sistemas que analisam mais de 40 amostras mensalmente, e o Sistema Municipal de Água e Esgoto de Piracicaba – SEMAE se inclui neste sistema.

Como observado anteriormente a água que sai da ETA 3, não apresenta coliformes totais, mas nove amostras, no total de coletas, apresentaram resultado positivo, constata-se que a contaminação pode estar ocorrendo durante de alguma forma durante a distribuição, ou ao fato de algumas células microbianas estarem resistindo aos processos de tratamento e se proliferando nas redes de distribuição. Um estudo realizado por van der Wende, Characklis e Smith (1989) demonstram que durante a distribuição da água potável ocorre um aumento significativo de microrganismos e isto se deve principalmente as células viáveis que conseguem atravessar todos os processos de purificação da água e que se proliferam quando encontram um ambiente favorável. Os resultados apresentados demonstram que seis das nove amostras positivas para coliformes totais são de águas armazenadas, sendo quatro de residências, o que indica a importância da análise de amostras residenciais e manutenção dos reservatórios, pois um

ambiente favorável para o crescimento microbiano pode acarretar no comprometimento da saúde do morador.

2.3.3 Contagem de microrganismos em meio R2A (REASONER; GELDREICH, 1985).

Segundo Jeffrey; Xu e Colwell (1991), a água tratada caracteriza-se como um ambiente oligotrófico, e a condição de estresse por falta de nutrientes pode debilitar as bactérias que ao serem semeadas em meios de cultivo com altas taxas de nutrientes disponíveis apresentam dificuldade e demora no crescimento. O meio R2A foi desenvolvido visando crescimento destes microrganismos, pois possui varias fontes de carbono em baixas concentrações (REASONER; GELDREICH, 1985).

As metodologias para avaliar a presença de microrganismos viáveis podem variar e os resultados obtidos devem ser criticamente analisados, uma forma de verificar a eficácia destes métodos é comparar o crescimento em meios diferentes. Com o objetivo de comparar o crescimento microbiano entre um meio rico em nutrientes, como o TSA e o meio R2A, as amostras de água foram semeadas nestes dois meios e uma comparação de crescimento foi avaliada, através do numero de unidades formadoras de colônias por mL presentes em cada meio, sob mesma temperatura e tempo de incubação. Os dados de crescimento podem ser encontrados nas Tabelas 9, 10, 11 e 12 que revelam como a crescimento bacteriano pode ser diferente nos meios utilizados, o meio TSA na amostra R 01 água armazenada, da primeira coleta, apresentou resultado $<1,0$ UFC/mL, enquanto que o meio R2A obteve resultado de $3,1 \times 10^{-2}$ UFC/ml. Mas um dos resultados mais preocupantes observado foi na amostra EB 06 água armazenada, também na primeira coleta, o resultado da contagem do meio TSA foi $<1,0$ UFC/mL, dentro do limite de contagem total de heterotróficos exigidos pelo Ministério da Saúde, contudo a contagem no meio R2A revela que a concentração de heterotróficos nesta amostra é superior ao limite de 500 UFC/mL estabelecido pelo mesmo órgão, pois a contagem foi de $2,9 \times 10^{-4}$ UFC/mL. A água de abastecimento geralmente não oferece nutrientes necessários para o desenvolvimento microbiano, então estes precisam se adaptar para conseguir sobreviver neste ambiente, podendo ser incapazes de crescer em meios ricos como o TSA, mas capazes de serem detectados em meios com concentração nutricional baixa, como o R2A. Os exames realizados pelos Sistemas de Abastecimento de Água dos municípios, como o SEMAE, SANASA e até mesmo a CETESB, para a quantificação de microrganismos heterotróficos utilizam meios ricos em nutriente como o

TSA, PCA (Plate Count Agar) e NA (Nutrient Agar), estes meios são utilizados convencionalmente por muitos anos, mas os dados obtidos neste trabalho revelaram que a utilização destes, pode mascarar a real carga microbiana existente. Segundo Head, Saunders e Pickup (1998), a principal dificuldade para o estudo em laboratório das comunidades presentes em ambiente desfavoráveis ou estressantes, se deve ao fato de não se conseguir aplicar a mesma condição em que os mesmos se desenvolvem no ambiente. Portanto, sugere-se que o meio R2A seja utilizado para a contagem total de microrganismos heterotróficos ao invés de se utilizar os meios ricos como o TSA, pois o meio R2A é o que mais se aproxima, até agora, da condição oligotrófica que estes os microrganismos estão presentes (água tratada).

Tabela 9 – Resultado da contagem total de microrganismos nos meios TSA e R2A nas amostras residenciais da primeira coleta

Residências	Contagem de Microrganismos Heterotróficos em TSA – UFC/mL		Contagem de Microrganismos Oligotróficos em R2A - UFC/mL	
	Distribuição	Armazenada	Distribuição	Armazenada
01	1,0	<1,0	$1,3 \times 10^{-1}$	$3,1 \times 10^{-2}$
02	<1,0	2,0	7	$1,1 \times 10^{-1}$
03	<1,0	<1,0	1,0	<1,0
04	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
05	<1,0	<1,0	<1,0	$5,5 \times 10^{-1}$
06	<1,0	-	$6,2 \times 10^{-1}$	-
07	<1,0	2,0	<1,0	5,0
08	1,0	1,0	1,0	$3,8 \times 10^{-2}$
09	<1,0	<1,0	1,0	5,0
10	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
11	<1,0	8,0	$2,4 \times 10^{-1}$	$2,6 \times 10^{-2}$
12	<1,0	<1,0	01	$4,3 \times 10^{-1}$
13	<1,0	<1,0	$1,0 \times 10^{-1}$	$1,4 \times 10^{-1}$
14	<1,0	1,0	<1,0	1,0

<1,0 – Limite de Detecção do Método; UFC – Unidades Formadoras de Colônias.

Tabela 10 – Resultado da contagem total de microrganismos nos meio TSA e R2A nas amostras das estações de bombeamento da primeira coleta

Estações de Bombeamento	Contagem de Microrganismos Heterotróficos em TSA – UFC/mL		Contagem de Microrganismos Oligotróficos em R2A - UFC/mL	
	Distribuição	Armazenada	Distribuição	Armazenada
01	-	<1,0	-	1,0
02	-	-	-	-
03	-	<1,0	-	2,2 x10 ⁻¹
04	<1,0	<1,0	<1,0	7,0
05	<1,0	<1,0	<1,0	4,4 x10 ⁻¹
06	<1,0	<1,0	<1,0	2,9 x10 ⁻⁴
07	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
08	-	<1,0	-	<1,0
09	<1,0	1,0	5,0	5,5 x10 ⁻¹
10	<1,0	<1,0	<1,0	1,5 x10 ⁻¹
11	-	<1,0	-	4,0 x10 ⁻¹
12	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
13	-	<1,0	-	1,1 x10 ⁻¹

<1,0 – Limite de Detecção do Método; UFC – Unidades Formadoras de Colônias.

Tabela 11 – Resultado da contagem total de microrganismos nos meio TSA e R2A nas amostras residenciais da segunda coleta

Residências	Contagem de Microrganismos Heterotróficos em TSA – UFC/mL		Contagem de Microrganismos Oligotróficos em R2A - UFC/mL	
	Distribuição	Armazenada	Distribuição	Armazenada
01	1,0	4,0	<1,0	9,0
02	1,0	1,0	1,0	4,0 x10 ⁻¹
03	<1,0	<1,0	<1,0	2,7 x10 ⁻¹
04	<1,0	2,3 x10 ⁻¹	1,8 x10 ⁻¹	1,2 x10 ⁻²
05	<1,0	<1,0	2,7 x10 ⁻¹	5,3 x10 ⁻¹
06	<1,0	-	5,5 x10 ⁻¹	-
07	1,0	3,3 x10 ⁻¹	3,6 x10 ⁻¹	1,2 x10 ⁻²
08	1,0	4,4 x10 ⁻¹	1,0	1,0 x10 ⁻²
09	21 x10 ⁻¹	4,7 x10 ⁻¹	3,0	2,8 x10 ⁻²
10	1,0	<1,0	4,0	2,6 x10 ⁻¹
11	<1,0	7,0	1,0	1,2 x10 ⁻³
12	1,0	<1,0	<1,0	<1,0
13	<1,0	<1,0	1,0	2,4 x10 ⁻¹
14	<1,0	<1,0	<1,0	4,0 x10 ⁻¹

<1,0 – Limite de Detecção do Método; UFC – Unidades Formadoras de Colônias.

Tabela 12 – Resultado da contagem total de microrganismos nos meio TSA e R2A nas amostras das estações de bombeamento da segunda coleta

Estações de Bombeamento	Contagem de Microrganismos Heterotróficos em TSA – UFC/mL		Contagem de Microrganismos Oligotróficos em R2A - UFC/mL	
	Distribuição	Armazenada	Distribuição	Armazenada
01	-	<1,0	-	2,0
02	-	<1,0	-	6,0
03	-	1,0	-	1,2 x10 ⁻¹
04	1,0	<1,0	1,0	1,1 x10 ⁻¹
05	<1,0	<1,0	<1,0	1,8 x10 ⁻¹
06	<1,0	2,0	<1,0	6,0
07	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
08	-	<1,0	-	1,0
09	<1,0	<1,0	<1,0	5,3 x10 ⁻¹
10	<1,0	1,0	<1,0	1,3 x10 ⁻¹
11	-	<1,0	-	1,0
12	<1,0	1,0	<1,0	2,0
13	-	<1,0	-	1,0

<1,0 – Limite de Detecção do Método; UFC – Unidades Formadoras de Colônias.

2.3.4 Pesquisa de bactérias utilizando a técnica do SSCP

O crescimento bacteriano em meios sintéticos consegue detectar somente de 1% da população presente em sistemas de água tratada (WARD et al., 1986), como a água clorada não oferece uma fonte nutricional adequada para o desenvolvimento microbiano, podendo levar a injúria celular e dificultando o cultivo em laboratório, muitas técnicas moleculares têm sido utilizadas, não só para análises de água, mas também para diversos ambientes, para se conhecer a real composição microbiana presente, independente do cultivo (McFETERS; KIPPIN; LeCHAVALIER, 1986; DORIGO; VOLATIER; HUMBERT, 2005). Com o objetivo de identificar espécies bacterianas não cultiváveis ou que não tenham sido identificadas pelos métodos cultiváveis aplicados, utilizou-se a técnica de SSCP. Esta técnica se baseia na amplificação da região rDNA 16S a partir de DNA extraído diretamente de amostras, obtenção de fita simples do fragmento e eletroforese em gel de poliacrilamida, após a denaturação, quando colocada em baixas temperaturas a fita simples de DNA tende a adotar uma conformação tridimensional determinada pela interação intramolecular que influencia na mobilidade eletroforética no gel de poliacrilamida (SCHMALENBERGER; TEBBE, 2003;). Os fragmentos de PCR possuem o mesmo tamanho, mas com seqüências diferentes de nucleotídeos e podem ser

separados pela diferença na mobilidade eletroforética (DORIGO; VOLATIER; HUMBERT, 2005).

A separação eletroforética das bandas de algumas amostras, pode ser observada nas Figuras 3 e 4, durante toda a fase experimental, das duas coletas, 22 géis foram preparados, nestas figuras pode-se observar dois destes géis, um da primeira coleta e outro da segunda coleta respectivamente. Após a coloração, os géis foram analisados utilizando o Software Kodak Digital Science 1D Image Analysis, onde bandas foram selecionadas, extraídas do gel, amplificadas e sequenciadas, para identificação das bactérias presentes (Lee; Zo; Kim, 1996), a Figura 5 mostra amplificação das bandas retiradas do gel. A diferença de intensidade de coloração das bandas dentro de uma mesma amostra, Figuras 3 e 4, pode ser explicada pela quantidade do DNA genômico dos microrganismos presentes em cada amostra, ou seja, está diretamente relacionado com o número de células presentes dentro da amostra, quanto maior o número de cópias do DNA de um determinado organismo presente dentro de uma população maior será o número de cópias durante o PCR, pois o mesmo se torna preferencial. Outro fator que também pode influenciar a amplificação é a qualidade do DNA genômico extraído, esta qualidade pode ser evidenciada pela qualidade do produto de PCR observada em gel de agarose. Vaughan et al (2001) descrevem que o sucesso de pesquisas utilizando métodos moleculares, depende principalmente de uma boa extração, pureza e qualidade do DNA a ser utilizado.

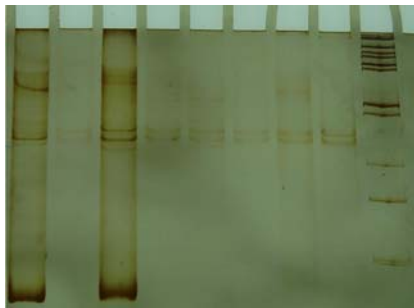


Figura 3 – Foto de Gel de SSCP de amostras da Primeira coleta.

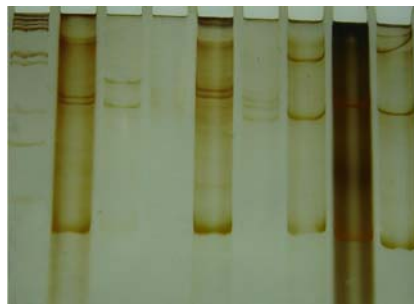


Figura 4 – Foto de Gel de SSCP de amostras da Segunda coleta.

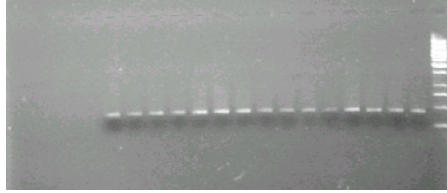


Figura 5 – Amostras amplificadas a partir das bandas retiradas do gel de SSCP.

2.3.5 Resultado do sequenciamento.

Para a identificação das bactérias detectadas nos métodos cultiváveis foram selecionadas na primeira coleta 25 colônias no meio TSA e 72 no meio R2A, e na segunda coleta 33 e 100 colônias respectivamente, após o isolamento do DNA genômico, as amostras foram amplificadas e encaminhadas para o sequenciamento. Para a identificação das bactérias presentes através do método molecular SSCP, todas as bandas selecionadas que apresentaram amplificação foram seqüenciadas. Os cromatogramas obtidos foram examinados, para verificação da qualidade das seqüências, utilizando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor, e então comparadas com as seqüências depositadas no banco de dados publico Genbank do NCBI. Durante as comparações procurou-se observar o histórico de cada bactéria apresentada, e constatou-se que muitas também haviam sido identificadas em ambientes aquáticos como rios, lagos e água de abastecimento. Para se obter uma maior segurança quanto ao grau de similaridade na comparação de seqüências com as depositadas em bancos de dados deve-se observar o histórico das mesmas para associar-se ao ambiente do isolado comparado e também se deve considerar somente amostras com similaridade acima de 70%, frente a isso somente as seqüências acima desta faixa foram consideradas no trabalho (HÖFLE et al., 2005).

2.3.5.1 Comparação entre os três métodos utilizados na identificação de bactérias no sistema de distribuição.

Os três métodos de isolamento de bactérias utilizado neste trabalho visavam à identificação de espécies de comunidades com metabolismos diferentes, mas todos se propondo a identificar a real carga microbiana presente em todo sistema de abastecimento de água da cidade. O meio TSA é considerado rico em nutrientes e visam o crescimento de microrganismos em geral, aqueles que não requerem condições especiais para o crescimento e está em entre os meio convencionalmente utilizados para avaliação da qualidade da água. O meio R2A apresenta varias fontes de energia, mas em baixas concentrações e visa o crescimento de microrganismos

oligotróficos e a Técnica Molecular do SSCP visa à identificação de microrganismos tanto cultiváveis como não cultiváveis. A ocorrência das espécies bacterianas identificadas na primeira coleta utilizando os três métodos é apresentada na Tabela 13. Foram identificadas na primeira coleta um total de 58 espécies, e comparando os três métodos utilizados 94,82% das espécies foi identificada pelo método do SSCP, 50% através do meio R2A e apenas 17,24% através do meio TSA. Estes resultados mostram que o método molecular identificou a maioria das espécies presentes no sistema de distribuição no período de estiagem (primeira coleta), espécies como *Dechloromonas sp.*, degradador de compostos inorgânicos, *Escherichia sp.*, indicador de contaminação e patógenos como *Salmonella sp.*, *Salmonella typhi* e *Staphylococcus aureus* não apareceram nos métodos cultiváveis, somente foram identificados através do método molecular.

Tabela 13 - Ocorrência das Espécies identificadas pelos três métodos no Sistema de Abastecimento – Primeira Coleta.

(continua)

Microrganismo	Código NCBI	TSA	R2A	SSCP
<i>Acinetobacter sp.</i>	DQ834359.1	0	1	1
<i>Actinobacterium sp.</i>	DQ834359.1	0	0	1
<i>Alpha proteobacterium</i>	AB097983.1	0	1	2
<i>Bacillaceae bacterium</i>	DQ520827.1	0	0	1
<i>Bacillus badius</i>	AY8003745.1	0	1	1
<i>Bacillus cereus</i>	AM419181.1	0	0	1
<i>Bacillus cereus</i>	AY315432.1	0	2	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	DQ922951.1	0	2	2
<i>Bacillus mucilaginosus</i>	DQ898310.1	0	1	0
<i>Bacillus pumilus</i>	EF070205.1	0	0	2
<i>Bacillus pumilus</i>	DQ073605.1	0	2	1
<i>Bacillus sp.</i>	EF370050.1	0	0	1
<i>Bacillus sp.</i>	AM423146.1	0	1	1
<i>Bacillus sp.</i>	AY764133.1	0	1	1
<i>Bacillus sp.</i>	DQ387866.1	0	0	2
<i>Bacillus sp.</i>	AY372926.1	1	1	1
<i>Bacillus subtilis</i>	AY787000.1	1	1	2
<i>Bacillus subtilis</i>	DQ438973.1	0	1	0
<i>Bacillus thuringiensis</i>	EF540452.1	0	0	1
<i>Bacterium sp.</i>	AJ536688.1	1	2	1

Tabela 13 - Ocorrência das Espécies identificadas pelos três métodos no Sistema de Abastecimento – Primeira Coleta.

(continuação)

Microrganismo	Código NCBI	TSA	R2A	SSCP
<i>Bacterium sp.</i>	AB202184.2	0	0	1
<i>Brevibacillus invocatus</i>	AB112718.1	0	2	1
<i>Brevibacterium sp.</i>	AM158906.2	0	0	1
<i>Burkholderiales bacterium</i>	EF636133.1	1	1	2
<i>Burkholderiales sp.</i>	EF636135.1	0	1	1
<i>Chryseobacterium sp.</i>	AB264125.1	0	2	5
<i>Chryseobacterium sp.</i>	EF566916.1	0	1	1
<i>Citrobacter farmeri</i>	AF025371.1	2	1	3
<i>Cohnia termotolerans</i>	AJ971483.1	0	0	2
<i>Dechloromonas sp.</i>	AM421792.1	0	0	7
<i>Drinking water bacterium</i>	AY328824.1	0	0	3
<i>Escherichia sp.</i>	DQ376907.1	0	0	1
<i>Flectobacillus sp.</i>	AY308840.1	0	0	1
Grupo Enterico	AF208013.1	0	6	4
<i>Kartecchner caverns</i>	DQ205298.1	1	0	1
<i>Limnobacter sp.</i>	EF540452.1	1	2	6
<i>Microbacterium sp.</i>	DQ119293.3	0	2	2
<i>Novosphingobium sp.</i>	DQ137853.2	1	3	3
<i>Opitutus sp.</i>	X99392.1	0	0	1
<i>Porphyrobacter tepidarius</i>	AY048657.1	0	0	3
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	AY850170.1	0	0	2
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	AF181570.1	0	0	1
<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	2	6	7
<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ119293.1	0	2	2
<i>Pseudomonas sp.</i>	EF675623.1	0	0	4
<i>Salmonella sp</i>	AY379978.1	0	0	3
<i>Salmonella typhi</i>	EU118115.1	0	0	1
<i>Sphingobacteriales bacterium</i>	EF636193.1	0	1	1
<i>Sphingomonas sp</i>	AY162145.1	4	9	15
<i>Sphingomonas sp</i>	AB242800.1	0	1	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	AP009324.1	0	0	4
<i>Uncultured Bacillales bacterium</i>	AY532444.1	0	0	1
<i>Uncultured Bacteroidetes</i>	EF100644.1	0	0	1

Tabela 13 - Ocorrência das Espécies identificadas pelos três métodos no Sistema de Abastecimento – Primeira Coleta.

(conclusão)

Microrganismo	Código NCBI	TSA	R2A	SSCP
<i>Uncultured bacterium</i>	DQ658783.1	0	0	2
<i>Uncultured bacterium</i>	DQ520179.1	0	1	4
<i>Uncultured bacterium</i>	DQ327679.1	0	0	1
<i>Uncultured Ochrobacterium</i>	DQ355173.2	0	0	1
<i>Xantobacter sp.</i>	AY429710.1	0	0	1

Na segunda coleta o número de espécies identificadas foi maior em relação à primeira coleta registrando-se 74 espécies, ou 27,58% a mais que na primeira coleta, isto provavelmente ocorreu devido ao volume de chuvas e alta vazão do Rio Corumbataí, neste período. Novamente o método molecular indicou um maior número de espécies presentes, 93,24% do total de identificados nesta amostragem, o meio R2A representou 33,78% dos identificados e o meio TSA apenas 16,21%. Tabela 14 mostrar a ocorrência das espécies comparando, também, os três métodos de identificação utilizados. Uma grande parte das espécies que ocorreram na primeira coleta voltou a aparecer na segunda, mas algumas exceções como *Bacillus anthracis*, *Shigella flexneri* e *Streptomyces sp.*, identificadas somente na segunda coleta, também somente pelo método molecular. Um estudo realizado por Jeffrey; Xu e Colwell (1991) demonstraram que algumas bactérias expostas a ambientes com baixas condições nutricionais, utilizando um ou mais mecanismos para sobreviver e através disto conseguem manter-se viáveis no ambiente, porém não cultiváveis, os gêneros encontrados por eles incluem os gêneros, *Escherichia*, *Vibrio*, *Salmonella*, *Aeromonas*, *Legionella*, *Campilobacter* e *Shigella*.

Tabela 14 – Ocorrência das Espécies identificadas pelos três métodos no Sistema de Abastecimento – Segunda Coleta.

(continua)

Microrganismo	Código NCBI	TSA	R2A	SSCP
<i>Acidovorax sp.</i>	AJ594865.1	0	0	2
<i>Acinetobacter sp.</i>	DQ834359.1	2	2	2
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	EF672060.1	0	0	1
<i>Actinobacterium sp.</i>	EF356018.1	0	0	3
<i>Alpha proteobacterium</i>	AB097983.1	0	0	2

Tabela 14 – Ocorrência das Espécies identificadas pelos três métodos no Sistema de Abastecimento – Segunda Coleta.

(continuação)

Microorganismos	Código NCBI	TSA	R2A	SSCP
<i>Bacillaceae bacterium</i>	DQ520827.1	0	0	1
<i>Bacillus anthracis</i>	AB190218.1	0	0	1
<i>Bacillus badius</i>	AY8003745.1	0	1	1
<i>Bacillus cereus</i>	AJ852040.1	1	2	1
<i>Bacillus cereus</i>	AY315432.1	0	1	2
<i>Bacillus licheniformis</i>	DQ922951.1	0	1	2
<i>Bacillus megaterium</i>	EF154249.1	0	0	2
<i>Bacillus mucilaginosus</i>	DQ898310.1	0	0	1
<i>Bacillus pumilus</i>	AJ494726.1	0	0	1
<i>Bacillus sp.</i>	EF370050.1	2	2	1
<i>Bacillus sp.</i>	AM423146.1	1	0	2
<i>Bacillus sp.</i>	AY764133.1	1	1	0
<i>Bacillus sp.</i>	DQ387866.1	0	0	2
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	AF329676	0	0	1
<i>Bacillus subtilis</i>	AY787000.1	0	0	2
<i>Bacillus subtilis</i>	DQ438973.1	2	1	1
<i>Bacterium sp.</i>	AJ536688.1	0	1	0
<i>Bacterium sp.</i>	AB202184.2	0	3	2
<i>Bacterium sp.</i>	AF538744.1	0	0	1
<i>Brevibacillus invocatus</i>	AB112718.1	1	2	0
<i>Burkholderiales bacterium</i>	EF636133.1	0	3	2
<i>Burkholderiales sp.</i>	EF636135.1	0	1	1
<i>Chryseobacterium sp.</i>	AB264125.1	0	2	1
<i>Chryseobacterium sp.</i>	EF566916.1	4	3	4
<i>Citrobacter sp.</i>	AF025371.1	0	0	1
<i>Citrobacter farmeri</i>	AF025371.1	0	0	1
<i>Cohnella panacavi</i>	AB271056.1	0	0	2
<i>Dechloromonas sp.</i>	AM421792.1	0	0	10
<i>Drinking water bacterium</i>	AY328824.1	0	0	2
<i>Escherichia sp.</i>	DQ376907.1	0	0	3
<i>Flavobacteriaceae sp.</i>	AY278614.1	0	0	1
<i>Flectobacillus</i>	AY308840.1	0	0	1
<i>Glacial ice bacterium</i>	AF479381.1	0	0	1

Tabela 14 - Ocorrência das Espécies identificadas pelos três métodos no Sistema de Abastecimento – Segunda Coleta.

(continuação)

Microrganismo	Código NCBI	TSA	R2A	SSCP
Grupo Enterico	AF208013.1	1	2	4
<i>Kartecchner caverns</i>	DQ205298.1	0	0	1
<i>Limnobacter sp.</i>	EF540452.1	0	2	5
<i>Microbacterium resistens</i>	EF619412.1	0	0	1
<i>Microbacterium sp.</i>	DQ119293.3	0	5	5
<i>Novosphingobium sp.</i>	DQ137853.2	1	1	1
<i>Opitutus sp.</i>	X99392.1	0	0	3
<i>Paenibacillus elgii</i>	AY090110.1	0	0	1
<i>Paenibacillus ehimensis</i>	EF025575.1	0	0	1
<i>Paenibacillus sp.</i>	AM402945.1	0	0	1
<i>Porphyrobacter sp.</i>	AB299749.1	0	0	2
<i>Pseudomonas alcaphilia</i>	EU082832.1	0	0	1
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	AY850170.1	0	0	3
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	AF181570.1	0	0	4
<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	0	7	13
<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ119293.1	0	1	0
<i>Pseudomonas sp.</i>	EF675623.1	1	4	3
<i>Salmonella sp.</i>	AY379978.1	0	0	2
<i>Salmonella typhi</i>	EU118115.1	0	0	4
<i>Shigella flexneri</i>	EU009188.1	0	0	7
<i>Sphingobacteriales bacterium</i>	EF636193.1	0	0	1
<i>Sphingomonas estrogenivorans</i>	DQ855413.1	0	0	4
<i>Sphingomonas sp</i>	AY162145.1	7	12	12
<i>Sphingomonas sp</i>	AB288313.0	0	3	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	AP009324.1	0	0	2
<i>Streptomyces sp.</i>	EU010382.1	0	0	2
<i>Thiobacillus sp.</i>	X97534.1	0	0	3
<i>Uncultured Bacillales bacterium</i>	AY532444.1	0	0	1
<i>Uncultured Bacterioidetes</i>	EF100644.1	0	0	1
<i>Uncultured bacterium</i>	EF574413.1	0	0	2
<i>Uncultured bacterium</i>	DQ520179.1	0	0	1
<i>Uncultured bacterium</i>	DQ327679.1	0	0	1
<i>Uncultured bacterium</i>	EF551864.1	0	0	3

Tabela 14 - Ocorrência das Espécies identificadas pelos três métodos no Sistema de Abastecimento – Segunda Coleta.

(conclusão)

Microrganismo	Código NCBI	TSA	R2A	SSCP
<i>Uncultured bacterium</i>	DQ658783.1	0	0	1
<i>Uncultured Methylobacterium</i>	AM691114.1	0	0	2
<i>Xantobacter flavus</i>	EF592179.1	0	1	1

Comparando as médias dos resultados, das duas coletas, observa-se que o número de bactérias isoladas pelo método de cultivo em meio rico TSA, foi menor 59,26% em relação ao meio R2A, revelando que certas bactérias podem ser difíceis de cultivar em meios ricos, mas podem ser identificadas no R2A. Segundo Martin e MacLeod (1984) métodos baseados na capacidade dos microrganismos crescerem dependem principalmente da condição nutricional exigida por eles, à composição do meio para o microrganismo se desenvolver em laboratório deve ser compatível com a sua necessidade nutricional. Vaerewijck et al. (2005) descrevem o aparecimento do gênero *Microbacteria* em sistemas públicos de abastecimento de água, e que apresentando-se nesta condição, este determinado gênero não cresce em meios de cultivo ricos em nutrientes, mas consegue se desenvolver em meios com baixa composição nutricional como o meio R2A. O resultado obtido na comparação de detecção de número de espécies entre os dois métodos cultiváveis testados neste trabalho ressaltou o resultado já apresentado no item **2.3.3 Contagem de microrganismos em meio R2A**, mostrando novamente que a aplicação de meios ricos nutricionalmente não consegue detectar toda a gama bacteriana presente no sistema de abastecimento de água ou em outros ambientes (SEIDLER et al., 1981; DEFIVES et al., 1999) e que os métodos aplicados para detectar bactérias, principalmente na água potável deveriam ser revistos, pois os meios utilizados deveriam se aproximar do ambiente em que estas bactérias se apresentam (HEAD; SAUNDERS; PICKUP, 1998).

A técnica molecular de SSCP demonstrou que a microbiota presente no sistema de abastecimento da cidade, na média das duas coletas, é 61,29% superior do que aquele apresentado pelos dois métodos cultiváveis testados. Segundo Ultee et al. (2004) muitos microrganismos estão adaptados para crescer em condições ambientais específicas, mas não estão adaptados para as condições laboratoriais de cultivo. Muitas das bactérias detectadas, neste trabalho, através deste método são Enterobactérias, geralmente presentes no esgoto e deveriam

ter sido indicadas através dos exames realizados para a determinação da potabilidade, contudo algumas amostras foram consideradas próprias para o consumo segundo os exames convencionais, não indicando a presença destas bactérias. Uma pesquisa realizada por MecFeters, Kippin e LeChevallier (1986) revela que microrganismos do grupo coliforme estavam presentes no sistema de água potável, mas deixaram de ser detectados por estarem injuriados, observando que na rotina dos sistemas de abastecimento a maioria dos microrganismos indicadores não são detectados pelos métodos cultiváveis e, também, defendem que a maioria das técnicas utilizadas para enumeração de bactérias em água são inadequadas para demonstrar a real carga microbiana.

O método aplicado utilizando o meio pobre em nutrientes, R2A, em associação com o método independente de cultivo SSCP, revela que existe contaminação de bactérias patogênicas na água consumida pela população, mas que foram consideradas apropriadas pelos exames convencionais exigidos pelo Ministério da Saúde, demonstrando que os indicadores de contaminação geralmente utilizados para este fim podem não estar abrangendo toda a carga bacteriana presente podendo colocar em risco a saúde pública. Como a qualidade da água potável é determinada, basicamente, pelo número de microrganismos cultiváveis presentes, certos microrganismos podem não ser detectados nas técnicas baseadas em métodos cultiváveis convencionais por serem de difícil isolamento e quantificação ou pela incapacidade de crescerem nas condições laboratoriais (WILLIAMS et al., 2004; VAEREWICK et al., 2005).

2.3.5.2 Frequência dos microrganismos presentes em todo o sistema de distribuição de água potável.

No intuito de se avaliar se ocorre à disseminação microbiana no sistema se existem possíveis focos de contaminação na rede de distribuição foram avaliados diversos pontos conformes demonstrado em Material e Métodos, os dados analíticos de cada ponto amostrado são apresentados na Tabelas 15 e 16. A Tabela 15 mostra a frequência do aparecimento de cada bactéria identificada na primeira coleta, pode-se observar que onze espécies diferentes foram identificadas no ponto de captação e mesmo após passar por todos os processos de tratamento, sete destas espécies foram identificadas em diferentes pontos do sistema de distribuição, incluindo amostras armazenadas em residências e estações de bombeamento. Estes resultados indicam que algumas espécies estão resistindo ao tratamento e purificação da água voltando a aparecer durante o abastecimento, como é o caso de um dos gêneros de *Sphingomonas sp.*,

detectados, este foi identificado primeiro no ponto de captação e voltou a aparecer em mais outros vinte pontos no sistema. Segundo Tokajian et al. (2005), a presença de membros do gênero *Sphingomonads* no sistema de água potável não é muito bom, pois muitas espécies deste gênero são considerados patógenos potenciais. Muitos estudos demonstram que é comum a presença de *Sphingomonads* em água potável, por serem muito resistentes a ambientes desfavoráveis ao desenvolvimento microbiano e métodos eficientes que possam identificar a presença deste gênero é muito importante para a manutenção da saúde pública (KOSKINEN et al., 2000; TOKAJIAN; HASHWA, 2004).

Um indicativo de que existam focos de contaminações durante a distribuição da água é o aparecimento de microrganismos do Grupo Entérico, que envolvem espécies como *Klebsiella sp.* e *Enterobacter sp.*, geralmente utilizados como indicadores de contaminação. Estes microrganismos não foram detectados no ponto de captação ou nas amostras coletadas dentro da ETA 3, mas foram identificadas em dois pontos de entrada de residências (R06 e R10), em três amostras de água armazenada de residências (R10; R11 e R12) e em uma amostra de água armazenada em estação de bombeamento (EB06). Como muitos microrganismos desta família estão presentes no solo (BOONE; COSTENHOLZ; GARRITY, 2001) e o resultado do sequenciamento indicou a presença de membros do grupo entérico e não um microrganismo em específico, é possível afirmar que a presença destes microrganismos pode ser devido à contaminação através de tubulações danificadas onde água distribuída pode estar entrando em contato com o solo e contaminando-se. Mas o fato mais preocupante em relação aos focos de contaminação durante a distribuição da água potável, foi a presença do gênero *Salmonella sp.*, identificado em três residências (R01; R08 e R05), sendo que nesta última, na água armazenada, já que este gênero está presente principalmente no esgoto e é apontado como causador de muitas doenças veiculadas pela água, como exemplo a Febre Tifóide (ABRAHAM et al., 2007).

A análise da frequência dos microrganismos identificados na segunda coleta pode ser observada na Tabela 16. Nesta segunda coleta dezessete espécies diferentes foram identificadas no ponto de captação, sendo que quinze dessas espécies voltaram a aparecer em vários pontos da rede de abastecimento, dentro destas incluem-se gêneros como *Escherichia sp.*, identificado em duas amostras de entrada de residência (R03 e R09) e em uma estação de bombeamento, amostra armazenada (EB07), *Shigella flexneri*, identificada em três residências, sendo duas na água de distribuição (R04 e R12), em uma na água armazenada (R09) e em três estações de

bombeamento, sendo uma na amostra da distribuição (EB10) e duas na água armazenada (EB03 e EB12). Os membros do Grupo Entérico que foram identificados em uma amostra de água armazenada na estação de bombeamento EB09 e em quatro residências, duas na água de distribuição (R09 e R10) e duas na água armazenada (R08 e R12), correspondem em duas das mesmas amostras que apresentaram este resultado na primeira coleta (R10 distribuição e a R12 armazenada), isto é mais um indicio de possível foco de contaminação durante o trajeto. E novamente o gênero *Sphingomonas* que voltou a aparecer em outros vinte e três pontos do sistema, e em sua maioria nos mesmos pontos identificados na primeira coleta, como R02, R07, R08, R10, R11, R12, R13, EB06 e EB 11.

A presença de um patógeno como do gênero *Shigella* que provavelmente resistiu às etapas de tratamento e se disseminou pela rede de abastecimento chegando até os pontos de consumo, é muito preocupante, pois mostra a alta adaptabilidade que este patógeno pode possuir e também uma possível resistência a agentes antimicrobianos, já que o cloro estava presente, podendo colocar em risco a saúde da população. A resistência à ação de compostos antimicrobianos e antibióticos que microrganismo entéricos possuem também foi observado em um estudo realizado por Abraham et al. (2007), onde microrganismo patogênicos isolados de água provenientes de rios na Alemanha e também no Rio Tiete em São Paulo, se mostraram bastante resistentes.

Muitos dos microrganismos identificados na primeira coleta voltaram a estar presentes também na segunda coleta, como o caso do gênero *Chryseobacterium sp.* detectado no ponto de captação e em vários outros pontos na rede inclusive nas águas armazenadas, este microrganismo está principalmente associado na formação de biofilmes (BURMOLLE; HANSEN; SORENSEN, 2007), crescer sob formas de biofilmes na água potável é uma das grandes vantagens que certos microrganismos possuem, pois associados a estas comunidades a resistência à ação de agentes antimicrobianos, é maior (HOYLE; JASS; COSTERTON, 1990; SCHWARTZ; HOFFMANN; OBST, 2003). E o aparecimento de microrganismos envolvidos a este tipo de formação indica possíveis focos de contaminação, pois células microbianas que venham a sobreviver ao tratamento ou ocorrência de outras fontes de contaminação podem associar-se aos biofilmes levando ao comprometimento da qualidade da água distribuída. Segundo Walker e Keevil (1994) muitos biofilmes encontrados nas tubulações de redes de distribuição e em caixas de armazenamento de água potável são as principais fontes de contaminação da água.

Tabela 15 – Frequência dos microrganismos presentes no sistema de abastecimento – primeira coleta

(continua)

Microrganismos	Cód. NCBI	Pontos de Coleta																								
		ETA 3			R 01		EB 01		R 02		EB 02		R 03		EB 03		R 04		EB 04		EB 05		R 05		R 06	
		1	2	3	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A
<i>Acinetobacter sp.</i>	DQ834359.1															X										
<i>Actinobacterium sp.</i>	EF356018.1	X																								
<i>Alpha proteobacterium</i>	AB097983.1																								X	
<i>Bacillaceae bacterium</i>	DQ520827.1																									
<i>Bacillus badius</i>	AY8003745.1																X									
<i>Bacillus cereus</i>	AM419181.1																									
<i>Bacillus cereus</i>	AY315432.1																									
<i>Bacillus licheniformis</i>	DQ922951.1																								X	
<i>Bacillus mucilaginosus</i>	DQ898310.1																									
<i>Bacillus pumilus</i>	EF070205.1																									
<i>Bacillus pumilus</i>	DQ073460.1														X							X				
<i>Bacillus sp.</i>	EF370050.1																									
<i>Bacillus sp.</i>	AM423146.1																									
<i>Bacillus sp.</i>	AY764133.1				X																					
<i>Bacillus sp.</i>	DQ387866.1																									
<i>Bacillus subtilis</i>	AY787000.1	X						X	X																	
<i>Bacillus subtilis</i>	DQ438973.1																									
<i>Bacillus thuringiensis</i>	EF540452.1						X																			
<i>Bacterium sp.</i>	AJ536688.1																									
<i>Bacterium sp.</i>	AB202184.2	X																								
<i>Brevibacillus invocatus</i>	AB112718.1				X	X																				
<i>Brevibacterium sp.</i>	AM158906.2																									
<i>Burkholderiales bacterium</i>	EF636133.1																									
<i>Burkholderiales sp.</i>	EF636135.1																									
<i>Chryseobacterium sp.</i>	AB264125.1																X	X			X					
<i>Chryseobacterium sp.</i>	EF566916.1																									
<i>Citrobacter sp.</i>	AF025371	X																								
<i>Citrobacter farmeri</i>	AF025371.1														X											
<i>Cohnia termotolerans</i>	AJ971483.1							X																		
<i>Dechloromonas sp.</i>	AM421792.1																				X					
<i>Drinking water bacterium</i>	AY328824.1																				X					
<i>Escherichia sp.</i>	DQ376907.1	X						X																		

Tabela 15 – Frequência dos microrganismos presentes no sistema de abastecimento – primeira coleta

(continuação)

Microrganismos	Cód. NCBI	Pontos de Coleta																								
		ETA 3			R 01		EB 01		R 02		EB 02		R 03		EB 03		R 04		EB 04		EB 05		R 05		R 06	
		1	2	3	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A
<i>Flectobacillus sp.</i>	AY308840.1																									
Grupo Enterico	AF208013.1																									X
<i>Kartecchner caverns</i>	DQ205298.1	X	X																							
<i>Limnobacter sp.</i>	EF540452.1	X																								
<i>Microbacterium sp.</i>	DQ119293.3								X														X			
<i>Novosphingobium sp.</i>	DQ137853.2																		X							
<i>Opitutus sp.</i>	X99392.1																									
<i>Porphyrobacter tepidarius</i>	AY048657.1																									
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	AY850170.1																									
<i>Pseudomonas</i>	AF181570.1																									
<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	X									X															
<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ119293.1																	X	X			X				
<i>Pseudomonas sp.</i>	EF675623.1																									
<i>Salmonella sp</i>	AY379978.1					X																			X	
<i>Salmonella typhi</i>	EU118115.1																									
<i>Sphingobacteriales bacterium</i>	EF636193.1					X																				
<i>Sphingomonas sp</i>	AY162145.1	X	X	X					X	X														X		
<i>Sphingomonas sp</i>	AB242800.1																							X		
<i>Staphylococcus aureus</i>	AP009324.1																		X							
<i>Uncultured Bacillales</i>	AY532444.1						X																			
<i>Uncultured Bacteriodes</i>	EF100644.1																		X							
<i>Uncultured bacterium</i>	EF551864.1	X																								
<i>Uncultured bacterium</i>	EF590046.1	X																								
<i>Uncultured bacterium</i>	DQ658783.1									X																
<i>Uncultured bacterium</i>	DQ520179.1																									X
<i>Uncultured bacterium</i>	DQ327679.1																									
<i>Uncultured Ochrobacterium</i>	DQ355173.2																						X			
<i>Xantobacter sp.</i>	AY429710.1																									

Tabela 15 – Frequência dos microrganismos presentes no sistema de abastecimento – primeira coleta

(continuação)

Microrganismos	Cód. NCBI	Pontos de Coleta																							
		R 07		EB 06		R 08		R 09		EB 07		R 10		EB 08		EB 11		R 11		EB 09		EB 10		R 12	
		E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A
<i>Acinetobacter sp.</i>	DQ834359.1																	X							
<i>Actinobacterium sp.</i>	EF356018.1																	X							
<i>Alpha proteobacterium</i>	AB097983.1																	X							
<i>Bacillaceae bacterium</i>	DQ520827.1									X															
<i>Bacillus badius</i>	AY8003745.1																								
<i>Bacillus cereus</i>	AM419181.1																X								
<i>Bacillus cereus</i>	AY315432.1																								
<i>Bacillus licheniformis</i>	DQ118379.1																								
<i>Bacillus mucilaginosus</i>	DQ898310.1																						X		
<i>Bacillus pumilus</i>	EF070205.1																								
<i>Bacillus pumilus</i>	DQ073605.1																								
<i>Bacillus sp.</i>	EF370050.1																								
<i>Bacillus sp.</i>	AM423146.1																								
<i>Bacillus sp.</i>	AY764133.1																								
<i>Bacillus sp.</i>	DQ387866.1																								
<i>Bacillus subtilis</i>	AY787000.1																								
<i>Bacillus subtilis</i>	DQ438973.1																								
<i>Bacillus thuringiensis</i>	EF540452.1																								
<i>Bacterium sp.</i>	AJ536688.1																								
<i>Bacterium sp.</i>	AB202184.2																								
<i>Brevibacillus invocatus</i>	AB112718.1																								
<i>Brevibacterium sp.</i>	AM158906.2																								
<i>Burkholderiales bacterium</i>	EF636133.1																								
<i>Burkholderiales sp.</i>	EF636135.1																								
<i>Chryseobacterium sp.</i>	AB264125.1	X																							
<i>Chryseobacterium sp.</i>	EF566916.1																								
<i>Citrobacter farmeri</i>	AF025371.1		X																						
<i>Cohnia termotolerans</i>	AJ971483.1																								
<i>Dechloromonas sp.</i>	AM421792.1																								
<i>Drinking water bacterium</i>	AY328824.1																								
<i>Escherichia sp.</i>	DQ376907.1																								

Tabela 15 – Frequência dos microrganismos presentes no sistema de abastecimento – primeira coleta

(continuação)

Microrganismos	Cód. NCBI	Pontos de Coleta																							
		R 07		EB 06		R 08		R 09		EB 07		R 10		EB 08		EB 11		R 11		EB 09		EB 10		R 12	
		E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A
<i>Flectobacillus sp.</i>	AY308840.1										X														
Grupo Enterico	AF208013.1			X							X	X						X							X
<i>Kartecchner caverns</i>	DQ205298.1																								
<i>Limnobacter sp.</i>	EF540452.1																				X				X
<i>Microbacterium sp.</i>	DQ119293.3															X									
<i>Novosphingobium sp.</i>	DQ137853.2					X																			
<i>Opitutus sp.</i>	X99392.1			X																					
<i>Porphyrobacter tepidarius</i>	AY048657.1	X					X																X		
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	AY850170.1										X											X			
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	AF181570.1																	X							
<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1		X			X					X					X							X	X	
<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ119293.1																								
<i>Pseudomonas sp.</i>	EF675623.1																X								
<i>Salmonella sp</i>	AY379978.1				X																				
<i>Salmonella typhi</i>	EU118115.1			X																					
<i>Sphingobacteriales bacterium</i>	EF636193.1					X																			
<i>Sphingomonas sp</i>	AY162145.1	X		X		X					X				X	X		X			X		X		X
<i>Sphingomonas sp</i>	AB242800.1																								
<i>Staphylococcus aureus</i>	AP009324.1										X														
<i>Uncultured Bacillales</i>	AY532444.1																								
<i>Uncultured Bacterioidetes</i>	EF100644.1																								
<i>Uncultured bacterium</i>	EF551864.1																								
<i>Uncultured bacterium</i>	EF590046.1																								
<i>Uncultured bacterium</i>	DQ658783.1				X																				
<i>Uncultured bacterium</i>	DQ520179.1	X						X															X		
<i>Uncultured bacterium</i>	DQ327679.1																								X
<i>Uncultured Ochrobacterium</i>	DQ355173.2																								
<i>Xantobacter sp.</i>	AY429710.1			X																					

Tabela 15 – Frequência dos microrganismos presentes no sistema de abastecimento – primeira coleta

(continuação)

Microrganismos	Cód. NCBI	Pontos de Coleta							
		EB 12		R 13		EB 13		R 14	
		E	A	E	A	E	A	E	A
<i>Acinetobacter sp.</i>	DQ834359.1								
<i>Actinobacterium sp.</i>	EF356018.1								
<i>Alpha proteobacterium</i>	AB097983.1								
<i>Bacillaceae bacterium</i>	DQ520827.1								
<i>Bacillus badius</i>	AY8003745.								
<i>Bacillus cereus</i>	AM419181.								
<i>Bacillus cereus</i>	AY315432.1			X	X				
<i>Bacillus licheniformis</i>	DQ922951.1								
<i>Bacillus mucilaginosus</i>	DQ898310.1								
<i>Bacillus pumilus</i>	EF070205.1								
<i>Bacillus pumilus</i>	DQ073605.1								
<i>Bacillus sp.</i>	EF370050.1								
<i>Bacillus sp.</i>	AM423146.				X				
<i>Bacillus sp.</i>	AY764133.1					X			
<i>Bacillus sp.</i>	DQ387866.1			X					
<i>Bacillus subtilis</i>	AY787000.1								
<i>Bacillus subtilis</i>	DQ438973.1								
<i>Bacillus thuringiensis</i>	EF540452.1								
<i>Bacterium sp.</i>	AJ536688.1	X							
<i>Bacterium sp.</i>	AB202184.2					X			
<i>Brevibacillus invocatus</i>	AB112718.1								
<i>Brevibacterium sp.</i>	AM158906.								
<i>Burkholderiales bacterium</i>	EF636133.1							X	
<i>Burkholderiales sp.</i>	EF636135.1								
<i>Chryseobacterium sp.</i>	AB264125.1								
<i>Chryseobacterium sp.</i>	EF566916.1								
<i>Citrobacter farmeri</i>	AF025371.1				X				
<i>Cohnia termotolerans</i>	AJ971483.1							X	
<i>Dechloromonas sp.</i>	AM421792.					X		X	
<i>Drinking water bacterium</i>	AY328824.1								
<i>Escherichia sp.</i>	DQ376907.1								

Tabela 15 – Frequência dos microrganismos presentes no sistema de abastecimento – primeira coleta

(conclusão)

Microrganismo	Cód. NCBI	Ponto de Coleta							
		EB 12		R 13		EB 13		R 14	
		E	A	E	A	E	A	E	A
<i>Flectobacillus sp.</i>	AY308840.1								
Grupo Enterico	AF208013.1								
<i>Kartecchner caverns</i>	DQ205298.1								
<i>Limnobacter sp.</i>	EF540452.1			X		X			
<i>Microbacterium sp.</i>	DQ119293.3			X					
<i>Novosphingobium sp.</i>	DQ137853.2								
<i>Opitutus sp.</i>	X99392.1								
<i>Porphyrobacter tepidarius</i>	AY048657.1								
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	AY850170.1								
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	AF181570.1								
<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1		X		X				
<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ119293.1								
<i>Pseudomonas sp.</i>	EF675623.1			X	X			X	
<i>Salmonella sp</i>	AY379978.1								
<i>Salmonella typhi</i>	EU118115.1								
<i>Sphingobacteriales bacterium</i>	EF636193.1								
<i>Sphingomonas sp</i>	AY162145.1	X	X	X	X				
<i>Sphingomonas sp</i>	AB242800.1								
<i>Staphylococcus aureus</i>	AP009324.1			X					
<i>Uncultured Bacillales</i>	AY532444.1								
<i>Uncultured Bacterioidetes</i>	EF100644.1								
<i>Uncultured bacterium</i>	EF551864.1								
<i>Uncultured bacterium</i>	EF590046.1								
<i>Uncultured bacterium</i>	DQ658783.1								
<i>Uncultured bacterium</i>	DQ520179.1								
<i>Uncultured bacterium</i>	DQ327679.1								
<i>Uncultured Ochrobacterium</i>	DQ355173.2								
<i>Xantobacter sp.</i>	AY429710.1								

1 – Água Captada; 2 – Pós – Tratamento;

3 – Reservatório do ETA 3.

E – Água de entrada (cavalete);

A – Água Armazenada.

Tabela 16 – Frequência dos microrganismos presentes no sistema de abastecimento – segunda coleta

(continua)

Microrganismos	Cód. NCBI	Pontos de Coleta																								
		ETA 3			R 01		EB01		R 02		EB02		R 03		EB03		R 04		EB 04		EB 05		R 05		R 06	
		1	2	3	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A
<i>Acidovorax sp.</i>	AJ594865.1			X																						
<i>Acinetobacter sp.</i>	DQ834359.1	X																								X
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	EF672060.1																									
<i>Actinobacterium sp.</i>	EF356018.1	X																								
<i>Alpha proteobacterium</i>	AB097983.1											X														
<i>Bacillaceae bacterium</i>	DQ520827.1															X										
<i>Bacillus anthracis</i>	AB190218.1																									
<i>Bacillus badius</i>	AY8003745.1																X									
<i>Bacillus cereus</i>	AJ852040.1																									
<i>Bacillus cereus</i>	AY315432.1								X																	
<i>Bacillus licheniformis</i>	DQ922951.1															X								X		
<i>Bacillus megaterium</i>	EF154249.1																X									
<i>Bacillus mucilaginosus</i>	DQ898310.1																X									
<i>Bacillus pumilus</i>	AJ494726.1																X									
<i>Bacillus sp.</i>	EF370050.1					X		X	X								X									
<i>Bacillus sp.</i>	AM423146.1																									
<i>Bacillus sp.</i>	AY764133.1																									
<i>Bacillus sp.</i>	DQ387866.1								X				X													
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	AF329676																									
<i>Bacillus subtilis</i>	AY787000.1					X																		X		
<i>Bacillus subtilis</i>	DQ438973.1																									
<i>Bacterium sp.</i>	AJ536688.1															X										
<i>Bacterium sp.</i>	AB202184.2	X							X				X				X									
<i>Bacterium sp.</i>	AF538744.1	X								X																
<i>Brevibacillus invocatus</i>	AB112718.1								X																	
<i>Burkholderiales bacterium</i>	EF636133.1																							X		
<i>Burkholderiales sp.</i>	EF636135.1																									
<i>Chryseobacterium sp.</i>	AB264125.1																								X	
<i>Chryseobacterium sp.</i>	EF566916.1	X	X						X						X									X		X
<i>Citrobacter sp.</i>	AF025371.1	X																								
<i>Citrobacter farmeri</i>	AF025371.1					X																				
<i>Cohnella panacavi</i>	AB271056.1																									
<i>Dechloromonas sp.</i>	AM421792.1					X			X				X													

Tabela 16 – Frequência dos microrganismos presentes no sistema de abastecimento – segunda coleta

(continuação)

Microrganismos	Cód. NCBI	Pontos de Coleta																								
		ETA 3			R 01		EB01		R 02		EB02		R 03		EB 03		R 04		EB 04		EB 05		R 05		R 06	
		1	2	3	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A
<i>Drinking water bacterium</i>	AY328824.1												X													
<i>Escherichia sp.</i>	DQ376907.1	X																								
<i>Flavobacteriaceae sp.</i>	AY278614.1																									
<i>Flectobacillus</i>	AY308840.1																									
<i>Glacial ice bacterium</i>	AF479381.1																		X							
Grupo Enterico	AF208013.1	X																								
<i>Kartecchner caverns</i>	DQ205298.1																									
<i>Limnobacter sp.</i>	EF540452.1	X																								
<i>Microbacterium resistens</i>	EF619412.1																		X							
<i>Microbacterium sp.</i>	DQ119293.3								X	X		X									X					X
<i>Novosphingobium sp.</i>	DQ137853.2								X																	X
<i>Opitutus sp.</i>	X99392.1																X									
<i>Paenibacillus elgii</i>	AY090110.1																									
<i>Paenibacillus ehimensis</i>	EF025575.1																									
<i>Paenibacillus sp.</i>	AM402945.1																		X							
<i>Porphyrobacter sp.</i>	AB299749.1																									
<i>Pseudomonas alcaphilia</i>	EU082832.1																			X						
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	AY850170.1																								X	
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	AF181570.1																									
<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	X							X			X						X								
<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ119293.1																				X					
<i>Pseudomonas sp.</i>	EF675623.1	X											X		X					X						X
<i>Salmonella sp.</i>	AY379978.1																								X	
<i>Salmonella typhi</i>	EU118115.1																		X							
<i>Shigella fleneri</i>	EU009188.1	X															X	X								
<i>Sphingobacteriales bacterium</i>	EF636193.1																									
<i>Sphingomonas estrogenivorans</i>	DQ855413.1	X	X																							X
<i>Sphingomonas sp</i>	AY162145.1	X	X		X	X		X	X					X		X		X		X		X	X			
<i>Sphingomonas sp</i>	AB288313.0	X															X	X		X						
<i>Staphylococcus aureus</i>	AP009324.1																		X							
<i>Streptomyces sp.</i>	EU010382.1																				X					
<i>Thiobacillus sp.</i>	X97534.1												X													
<i>Uncultured Bacillales</i>	AY532444.1																		X							

Tabela 16 – Frequência dos microrganismos presentes no sistema de abastecimento – segunda coleta

(continuação)

Microrganismos	Cód. NCBI	Pontos de Coleta																								
		ETA 3			R 01		EB01		R 02		EB02		R 03		EB 03		R 04		EB 04		EB 05		R 05		R 06	
		1	2	3	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A
<i>Uncultured Bacterioidetes</i>	EF100644.1													X												
<i>Uncultured bacterium</i>	EF574413.1																									
<i>Uncultured bacterium</i>	DQ520179.1																									X
<i>Uncultured bacterium</i>	DQ327679.1																									
<i>Uncultured bacterium</i>	EF551864.1	X																			X					X
<i>Uncultured bacterium</i>	DQ658783.1								X																	
<i>Uncultured Methylobacterium</i>	AM691114.1	X																								X
<i>Xantobacter flavus</i>	EF592179.1								X					X												

Tabela 16 – Frequência dos microrganismos presentes no sistema de abastecimento – segunda coleta

(continuação)

Microrganismos	Cód. NCBI	Pontos de Coleta																							
		R 07		EB 06		R 08		R 09		EB 07		R 10		EB 08		EB 11		R 11		EB 09		EB 10		R 12	
		E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A
<i>Acidovorax sp.</i>	AJ594865.1											X													
<i>Acinetobacter sp.</i>	DQ834359.1	X						X				X	X												
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	EF672060.1																								X
<i>Actinobacterium sp.</i>	EF356018.1	X																							
<i>Alpha proteobacterium</i>	AB097983.1	X																							
<i>Bacillaceae bacterium</i>	DQ520827.1																								
<i>Bacillus anthracis</i>	AB190218.1				X																				
<i>Bacillus badius</i>	AY803745.1																								
<i>Bacillus cereus</i>	AJ852040.1																								
<i>Bacillus cereus</i>	AY315432.1																								
<i>Bacillus licheniformis</i>	DQ922951.1																								
<i>Bacillus megaterium</i>	EF154249.1																								
<i>Bacillus mucilaginosus</i>	DQ898310.1																								
<i>Bacillus pumilus</i>	AJ494726.1																								
<i>Bacillus sp.</i>	EF370050.1																								
<i>Bacillus sp.</i>	AM423146.1																								
<i>Bacillus sp.</i>	AY764133.1																								
<i>Bacillus sp.</i>	DQ387866.1																								

Tabela 16 – Frequência dos microrganismos presentes no sistema de abastecimento – segunda coleta

(continuação)

Microrganismos	Cód. NCBI	Pontos de Coleta																							
		R 07		EB 06		R 08		R 09		EB 07		R 10		EB 08		EB 11		R 11		EB 09		EB 10		R 12	
		E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	AF329676									X															
<i>Bacillus subtilis</i>	AY787000.1																								
<i>Bacillus subtilis</i>	DQ438973.1							X								X								X	
<i>Bacterium sp.</i>	AJ536688.1																								
<i>Bacterium sp.</i>	AB202184.2																								
<i>Bacterium sp.</i>	AF538744.1																								
<i>Brevibacillus invocatus</i>	AB112718.1		X																						
<i>Burkholderiales bacterium</i>	EF636133.1	X				X																			
<i>Burkholderiales sp.</i>	EF636135.1	X						X																	
<i>Chryseobacterium sp.</i>	AB264125.1			X																			X		
<i>Chryseobacterium sp.</i>	EF566916.1					X		X															X		
<i>Citrobacter farmeri</i>	AF025371.1																								
<i>Citrobacter sp.</i>	AF025371.1																								
<i>Cohnella panacavi</i>	AB271056.1							X						X											
<i>Dechloromonas sp.</i>	AM421792.1				X			X															X		
<i>Drinking water bacterium</i>	AY328824.1															X									
<i>Escherichia sp.</i>	DQ376907.1							X		X															
<i>Flavobacteriaceae sp.</i>	AY278614.1																								
<i>Flectobacillus sp.</i>	AY308840.1																								
<i>Glacial ice bacterium</i>	AF479381.1																								
Grupo Enterico	AF208013.1					X	X				X									X				X	
<i>Kartechner caverns</i>	DQ205298.1				X																				
<i>Limnobacter sp.</i>	EF540452.1					X					X	X												X	
<i>Microbacterium resistens</i>	EF619412.1																								
<i>Microbacterium sp.</i>	DQ119293.3	X	X			X				X									X				X		
<i>Novosphingobium sp.</i>	DQ137853.2					X																			
<i>Opiritatus sp.</i>	X99392.1				X																				
<i>Paenibacillus elgii</i>	AY090110.1																								
<i>Paenibacillus ehimensis</i>	EF025575.1															X			X						
<i>Paenibacillus sp.</i>	AM402945.1																								
<i>Porphyrobacter sp.</i>	AB299749.1															X									
<i>Pseudomonas alcaliphilia</i>	EU082832.1																								

Tabela 16 – Frequência dos microrganismos presentes no sistema de abastecimento – segunda coleta

(continuação)

Microrganismos	Cód. NCBI	Pontos de Coleta																							
		R 07		EB 06		R 08		R 09		EB 07		R 10		EB 08		EB 11		R 11		EB 09		EB 10		R 12	
		E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	AY850170.1																								X
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	AF181570.1		X																						X
<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1		X			X	X		X			X	X						X	X			X		X
<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ119293.1																								
<i>Pseudomonas sp.</i>	EF675623.1							X								X									
<i>Salmonella sp.</i>	AY379978.1									X															
<i>Salmonella typhi</i>	EU118115.1				X	X																			
<i>Shigella fleneri</i>	EU009188.1								X													X		X	
<i>Sphingobacteriales bacterium</i>	EF636193.1																				X				
<i>Sphingomonas estrogenivorans</i>	DQ855413.1																					X			
<i>Sphingomonas sp</i>	AY162145.1	X	X	X	X		X	X			X				X			X	X					X	
<i>Sphingomonas sp</i>	AB288313.0																								
<i>Staphylococcus aureus</i>	AP009324.1																								
<i>Streptomyces sp.</i>	EU010382.1										X														
<i>Thiobacillus sp.</i>	X97534.1							X																	
<i>Uncultured Bacillales bacterium</i>	AY532444.1																								
<i>Uncultured Bacteroidetes</i>	EF100644.1																								
<i>Uncultured bacterium</i>	EF574413.1															X					X				
<i>Uncultured bacterium</i>	DQ520179.1																								
<i>Uncultured bacterium</i>	DQ327679.1										X														
<i>Uncultured bacterium</i>	EF551864.1																								
<i>Uncultured bacterium</i>	DQ658783.1																								
<i>Xantobacter flavus</i>	EF592179.1		X																						

Tabela 16 – Frequência dos microrganismos presentes no sistema de abastecimento – segunda coleta

(continuação)

Microrganismos	Cód. NCBI	Pontos de Coleta							
		EB 12		R 13		EB 13		R 14	
		E	A	E	A	E	A	E	A
<i>Acidovorax sp.</i>	AJ594865.1								
<i>Acinetobacter sp.</i>	DQ834359.1								
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	EF672060.1								
<i>Actinobacterium sp.</i>	EF356018.1							X	
<i>Alpha proteobacterium</i>	AB097983.1								
<i>Bacillaceae bacterium</i>	DQ520827.1								
<i>Bacillus anthracis</i>	AB190218.1								
<i>Bacillus badius</i>	AY8003745.1								
<i>Bacillus cereus</i>	AJ852040.1								
<i>Bacillus cereus</i>	AY315432.1				X				
<i>Bacillus licheniformis</i>	DQ922951.1		X						
<i>Bacillus megaterium</i>	EF154249.1							X	
<i>Bacillus mucilaginosus</i>	DQ898310.1								
<i>Bacillus pumilus</i>	AJ494726.1								
<i>Bacillus sp.</i>	EF370050.1								
<i>Bacillus sp.</i>	AM423146.1				X				
<i>Bacillus sp.</i>	AY764133.1								
<i>Bacillus sp.</i>	DQ387866.1								
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	AF329676								
<i>Bacillus subtilis</i>	AY787000.1								
<i>Bacillus subtilis</i>	DQ438973.1								
<i>Bacterium sp.</i>	AJ536688.1								
<i>Bacterium sp.</i>	AB202184.2						X		
<i>Bacterium sp.</i>	AF538744.1								
<i>Brevibacillus invocatus</i>	AB112718.1						X		
<i>Burkholderiales bacterium</i>	EF636133.1			X				X	
<i>Burkholderiales sp.</i>	EF636135.1								
<i>Chryseobacterium sp.</i>	AB264125.1								
<i>Chryseobacterium sp.</i>	EF566916.1		X						
<i>Citrobacter farmeri</i>	AF025371.1								
<i>Citrobacter sp.</i>	AF025371.1								
<i>Cohnella panacavi</i>	AB271056.1								

Tabela 16 – Frequência dos microrganismos presentes no sistema de abastecimento – segunda coleta

(continuação)

Microrganismos	Cód. NCBI	Pontos de Coleta							
		EB 12		R 13		EB 13		R 14	
		E	A	E	A	E	A	E	A
<i>Dechloromonas sp.</i>	AM421792.1	X		X		X		X	
<i>Drinking water bacterium</i>	AY328824.1								
<i>Escherichia sp.</i>	DQ376907.1								
<i>Flavobacteriaceae sp.</i>	AY278614.1								
<i>Flectobacillus sp.</i>	AY308840.1			X					
<i>Glacial ice bacterium</i>	AF479381.1								
Grupo Enterico	AF208013.1								
<i>Kartecchner caverns</i>	DQ205298.1								
<i>Limnobacter sp.</i>	EF540452.1					X			
<i>Microbacterium resistens</i>	EF619412.1								
<i>Microbacterium sp.</i>	DQ119293.3								
<i>Novosphingobium sp.</i>	DQ137853.2								
<i>Opitutus sp.</i>	X99392.1							X	
<i>Paenibacillus elgii</i>	AY090110.1								
<i>Paenibacillus ehimensis</i>	EF025575.1								
<i>Paenibacillus sp.</i>	AM402945.1								
<i>Porphyrobacter sp.</i>	AB299749.1								
<i>Pseudomonas alcaphilia</i>	EU082832.1								
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	AY850170.1					X			
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	AF181570.1	X							
<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	X		X	X			X	X
<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ119293.1								
<i>Pseudomonas sp.</i>	EF675623.1			X	X			X	
<i>Salmonella sp.</i>	AY379978.1								
<i>Salmonella typhi</i>	EU118115.1					X			
<i>Shigella fleneri</i>	EU009188.1		X						
<i>Sphingobacteriales bacterium</i>	EF636193.1								
<i>Sphingomonas estrogenivorans</i>	DQ855413.1								
<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1				X			X	
<i>Sphingomonas sp.</i>	AB288313.0								
<i>Staphylococcus aureus</i>	AP009324.1							X	

Tabela 16 – Frequência dos microrganismos presentes no sistema de abastecimento – segunda coleta

(conclusão)

Microrganismos	Cód. NCBI	Pontos de Coleta							
		EB 12		R 13		EB 13		R 14	
		E	A	E	A	E	A	E	A
<i>Streptomyces sp.</i>	EU010382.1								
<i>Thiobacillus sp.</i>	X97534.1							X	
<i>Uncultured Bacillales</i>	AY532444.1								
<i>Uncultured Bacterioidetes</i>	EF100644.1								
<i>Uncultured bacterium</i>	EF574413.1								
<i>Uncultured bacterium</i>	DQ520179.1								
<i>Uncultured bacterium</i>	DQ327679.1								
<i>Uncultured bacterium</i>	EF551864.1								
<i>Uncultured bacterium</i>	DQ658783.1								
<i>Xantobacter flavus</i>	EF592179.1								

1 – Água Captada;

2 – Pós – Tratamento;

3 – Reservatório do ETA 3.

E – Água de entrada (cavalete);

A – Água Armazenada.

3 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se observar que a concentração de cloro na água armazenada nas residências possui concentração menor em relação à água distribuída, e isto pode ser em razão da falta manutenção dos reservatórios domiciliares e também a localização dos filtros de carvão ativado nas residências.

A utilização do método cultivável R2A em associação com o método molecular SSCP, possibilitou uma melhor visão da real constituição bacteriana da água de abastecimento, pois além de identificar uma maior número de bactérias, também detectaram a presença de patógenos que não aparecerem nos métodos convencionais, aferindo que os indicadores de contaminação utilizados podem não estar indicando a presença de patógenos.

Certas espécies de bactérias, algumas patogênicas, mostraram resistência aos processos de tratamento e purificação da água, pois foram detectadas no ponto de captação e em outros pontos da rede inclusive em amostras dos reservatórios domiciliares. E bactérias identificadas apenas em amostras coletadas na rede, indicam a existência de possíveis focos de contaminação durante a distribuição da água potável.

O número de bactérias detectada no ponto de captação e nas redes de abastecimento no período de chuvas, foi maior em relação ao período de seca indicando que a vazão do Rio Corumbataí pode influenciar na concentração de bactérias.

Os dados apresentam mostram que apesar do eficiente sistema de tratamento de água da cidade de Piracicaba - SP existem bactérias que resistem aos processos de tratamento disseminando-se pela rede e que há possíveis focos de contaminação na distribuição da água disponível ao consumo público. E que muitas destas bactérias não foram detectadas pelos métodos convencionalmente exigidos pelo Ministério da Saúde.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, W. R.; MACEDO, A. J.; GOMES, L. H.; TAVARES, F. C. A. Occurrence and Resistance of Pathogenic Bacteria Along the Tietê River Downstream of São Paulo in Brazil. **Clean**, Weinheim, v. 35, p. 339-347, 2007.
- ABREU, A. A. V. **Identificação de bactérias filamentosas em processos de lamas activadas através da técnica de identificação in situ de fluorescência (FISH)**. 2004. 142p Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Minho. 2004.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Molecular biology of the cell**, 3 rd. ed. New York: Garland Publishing, 1997.
- ALEGRE, H. Estatística aplicada ao controle de qualidade da água em redes de distribuição. **Recursos Hídricos**, São Paulo, v.16, n.2, 1994.
- AMANN, E. R., LUDWIG W., SHELEIFER, K-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Amsterdam, v.59, p.143-169, 1995.
- AMANN, E. R.; SNAIDR, M.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. In situ visualisation of high genetic diversity in a natural microbial community. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, p. 3496–3500, 1996.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA . **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 21th. ed. Washington, 2005. 1368p.
- ARMSTRONG, J. L.; SHIGENO, D. S.; CALOMIRIS, J. J.; SEIDLER, R. J. Antibiotic-resistant bacteria in drinking water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 42, p. 277-283, 1981.
- ARVANITIDOU, M.; VAYONA, A.; SPANAKIS, N.; TSAKRIS, A. Occurrence and antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria isolated in haemodialysis water and dialysate of renal units: results of a Greek multicentre study. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, p.180-185, 2003.
- BELL, J. B.; MACRAE, W. R.; ELLIOT, G. E. Incidence of R factors in coliform, fecal coliform, and *Salmonella* populations of the Red River in Canada. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 40, p. 486-491, 1980.
- BOIVIN, J. V.; RUIMY, R.; BIANCHI, A.; DAUMAS, S.; CHISTEN, R. Bacterial diversity in a deep-surface clay environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 3405-3412, 1996.

BOND, P. L.; HUGENHOLTZ, P.; KELLER, J.; BLACKALL, L. L. Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1910-1916, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518. **Norma de qualidade da água para consumo humano**. Brasília, 2004. 14p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 357**. Brasília, 2005. 23p.

BRITSCHGI, T. B.; GIOVANNONI, J. J. Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton population by rRNA gene cloning and sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1707-1713, 1991.

BRUCHET, A.; LEGRAND, M. F.; ARPINO, P.; DILETTATO, D. Recent methods for the determination of volatile and non-volatile organic compounds in natural and purified drinking water. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 562, p. 469-480, 1991.

BURMOLLE, M.; HANSEN, L. H.; SORENSEN, S. J. Establishment and early succession of a multispecies biofilm Composed of Soil Bacteria. **FEMS Microbial Ecology**, Oxford, v. 54, p. 352-362, 2007.

CARARO, D.N. **Manejo de irrigação por gotejamento para aplicação de água residuária visando à minimização do entupimento de emissores**. 2004. 149p. Tese (Doutorado em Irrigação e Drenagem) Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

CASES, I.; LORENZO, V. The grammar o (micro) biological diversity. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 4, p. 623-627, 2002

CHARACKLIS, W.G.; COOKSEY, K.E. Biofilms and microbial fouling. **Advances Applied Microbiology**, New York, v. 29, p. 93-138, 1983.

CHAVES, L.C.D. **Estudo da cinética de formação de biofilmes em superfícies em contacto com água potável**. 2004. 189p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Universidade do Minho, Minho, 2004.

CRUMP, J. A.; OKOTH, G. O.; SLUTSKER, L.; OGAJA, D. O.; KESWICK, B. H.; LUPY, S. P. Effect of point-of-use disinfection, flocculation and combined flocculation – disinfection of drinking water quality in Western Kenya. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, p.225-231, 2004.

D’AGUILA, P. S.; ROQUE, O. C. C.; MIRANDA, C. A. S.; FERREIRA, A. P. Avaliação da qualidade de água de abastecimento publico do município de Nova Iguaçu. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 3, p. 791-798, 2000.

DECKER, A. C. Água: tratamento e qualidade. Denver: American Water Works Association, 1964. 457p.

DEFIVES, C.; GUYARD, S.; OULARÉ, M. M.; HORNEZ, J. P. Total counts, culturable and viable, and non-culturable microflora of a French mineral water: a case study. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 86, p. 1033-1038, 1999.

DI BERNARDO, L.; DANTAS, A. D.B. **Métodos e técnicas de tratamento de água**. 2.ed. São Carlos: Rima, 2005. v.1, 792p.

DORIGO, U.; VOLATIER, L.; HUMBERT, J. F. Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. **Water Research**, Oxford, v. 39, p. 2207-2218, 2005.

DRANCOURT, M.; BOLLET, C.; CARLIOZ, A.; MARTELIN, R.; GAYRAL, J. P.; RAOULT, D. 16S Ribosomal DNA Sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 3623-3630, 2000.

EICHLER, A.; CHRISTEN, R.; HÖLTJE, C.; WESTPHAL, P.; BÖTEL, BRETTAR, I.; MEHLING, A.; HÖFLE, M. G. Composition and dynamics of bacteria communities of a drinking water supply system as assessed by RNA-and DNA-based 16S rRNA gene fingerprinting. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 1858-1872, 2006.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Preventing waterborne disease**, 1993. Disponível em: www.epa.gov/nerlcwww/h2odis.pdf. Acesso em: 05 Nov. 2007.

FEARY, T. W.; STURTEVANT, A. B. Jr.; LANKFORD, J. Antibiotic resistant coliforms in fresh and salt water. **Archives Environmental Health**, Washington, v. 25, p. 215-220, 1972.

FREDERICO, P. G. Curso de estatística experimental. 14 ed. Piracicaba: Nobel Editora. 2005. 477p.

GELDREICH, E. E.; NASH, H. D.; REASONER, D. J.; TAYLOR, R. H. The necessity of controlling bacterial populations in potable waters: community water supply. **Journal American Water Works Association**, Denver, v. 64, p. 596-602, 1972.

GOMES, L.H. **Construção de um vetor com o gene GFP de *Aequorea victoria* para a transformação de *Saccharomyces cerevisiae***. 2000. 73p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2000.

HAYES, P. R. **Food microbiology and hygiene**. 2nd. ed. London: Chapman & Hall, 1995. 516p.

HEAD, I.M.; SAUNDERS, J.R.; PICKUP, R.W. Microbial evolution diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology**, New York, v.35, p. 1-21, 1998.

- HÖFLE, M. G.; FLAVIER, S.; CHRISTEN, R.; BÖTEL, J.; LABRENZ, M.; BRETTAR, I. Retrieval of nearly complete 16S rRNA gene sequences from environmental DNA following 16S rRNA-based community fingerprinting. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 670-675, 2005.
- BOONE, D. R. ; COSTENHOLZ, R. W. ; GARRITY, G. M. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York : Springer, 2001. v.1.
- HOYLE, B.; JASS, J.; COSTERTON, J. The biofilm glycocalyx as a resistance factor. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 26, p. 1-5, 1990.
- JEFFREY, J. B.; XU, H.S.; COWELL, R. R.; Viable but nonculturable bacteria in drinking water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p.875-878, 1991.
- KALMBACH, S.; MANZ, W.; SZEWZYK, U. Isolation of new bacterial species from drinking water biofilms and proof of their in situ dominance with highly specific 16S rRNA probes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington v. 63, p. 560-568, 1997.
- KOSKINEN, R. A. V.; KAMPFER, T.; LAURIKKALA, M.; TSITKO, I.; KOSTYAL, E.; ATROSHI, F.; SALKINOJA, M. S. Characterization of *Sphingomonas* isolates from finish and swedish drinking water distribution systems. **Journal Applied Bacteriology**, Washington, v. 89, p. 687-696, 2000.
- KUZNETSOV, S. I; DUBININA, G. A; LAPTEVA, N. A. Biology of oligotrophic bacteria. **Annual Reviews Microbiology**, Palo Alto, v.33, p.377-387, 1979.
- LeCHEVALLIER, M. W.; McFETERS, G. A. Interactions between heterotrophic plate count bacteria and coliform organisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 49, p. 1338-1341, 1985.
- LeCHAVALLIER, M. W.; BADCOCK, T. M. LEE, R. G. Examination and characterization of distribution system biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, p. 2714-2724, 1987.
- LeCHEVALLIER, M. W.; CAWTHON, C. D.; LEE, R. G. Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, p.649-654, 1988.
- LeCHEVALLIER, M. W.; SCHULZ, W.; LEE, R. G. Bacteria nutrients in drinking water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p.857-862, 1991.
- LEE, D. H.; ZO, Y. G.; KIM, S. J. Nonradioative method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-Single-Strand-Conformation-Polymorphism. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 3112-3120, 1996.

LIPSITH, M.; BERGSTROM, C. T.; LEVIN, B. R. The epidemiology of antibiotic resistance in hospitals: Paradoxes and prescriptions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, p. 1938-1943, 2000.

LORENZI, A. S. **Abordagens moleculares para detector cianobactérias e seus genótipos produtores de microcistinas presentes nas represas Billings e Guarapiranga, São Paulo, Brasil**. 2004. 92p. Dissertação (Mestrado em Energia Nuclear na Agricultura). Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2004.

MARTIN, P.; MacLEOD, R. A. Observation on the distinction between oligotrophic and atrophic marine bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 47, p.1017-1022, 1984.

McFETERS, G. A.; KIPPIN, J. S.; LeCHAVALIER, M. W. Injured coliforms in drinking water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 51, p. 1-5, 1986.

MEYER, S. T. O uso de cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais a saúde pública. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 99-110, 1994.

MIETTINEN, I. T.; VARTIALNEN, T.; MARTIKAINEN, P. J. Contamination of drinking water. **Nature**, London, v. 381, p. 654-655, 1996.

MOMBA, M. N. B.; CLOETE, T.; VENTER, S.; KFIR, R. Evolution of the impact of disinfection processes on the formation of biofilms in potable surface water distribution systems. **Water Science Technology**, Oxford, v. 38, p. 283-289, 1998.

MOMBA, M. N. B.; CLOETE, T.; VENTER, S.; KFIR, R. Influence of disinfection processes on the microbial quality of potable groundwater in laboratory-scale system model. **Journal of Water Supply: Research and Technology – Aqua**, Oxford, v. 49, p. 23-33, 2000.

MORIN, P.; CAMPER, A.; JONES, W.; GATEL, D.; GOLDMANN, J. Colonization and disinfection of biofilms hosting coliforms colonized carbon fines. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 4428-4432, 1996.

MUYZER, G.; WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 695-700, 1993.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST. Acesso em: 30 Sept. 2007.

ORITA, M.; IWAHANA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K.; SEKIYA, T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as Single-Strand-Conformation-Polymorphisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 86, p. 2766-2770, 1989.

PALMA, G.M.S. **Diagnóstico ambiental qualidade da água e índices de depuração do Rio Corumbataí – SP**. 1999. 155p. Dissertação (Mestrado) Centro de Estudos Ambientais. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro. 1999.

PARSEKIAN, M. P. S. **Análise e proposta de formas de gerenciamento de estações de tratamento de águas de abastecimento completo em cidades de porte médio do estado de São Paulo**. 1998. 194p. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, 1998.

PELCZAR Jr., M. J; CHAN, E. C. S; KRIEG, N. R. **Microbiologia conceitos e aplicações**. 2.ed. São Paulo: McGraw – Hill, 1996. cap. 29, p 337-371.

PETERS, S.; KOSCHINSKY, S.; SCHWIEGER, F.; TEBBE, C. C. Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-Single-Strand-Conformation-Polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 930-936, 2000.

PIRACICABA. Serviço Municipal de água e Esgot – SEMAE. Disponível em: www.semaepiracicaba.org.br. Acesso em: 30 Out. 2007.

POINDEXTER, J. S. Oligotrophy. Fast and famine existence. **Advances in Microbial Ecology**, New York, v. 5, p. 63-89, 1981.

REASONER, D. J.; GELDREICH, E. E. A New medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 49, p.01-07, 1985.

RESENDE, R.S. **Suscetibilidade de gotejadores ao entupimento e avaliação do desentupimento via cloração da água de irrigação**. Piracicaba, 1999. 77p. Dissertação (Mestrado em Irrigação e Drenagem) Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1999.

ROSEN, G. **A History of public health**, Expanded edition, 1993. Disponível em: www.books.google.com. Acesso em 26 Sept 2007.

ROSZAK, D. B.; COLWELL, R. R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. **Microbiological Reviews**, New York, v. 51, p. 365-379, 1987.

SABY, S.; SIBILLE, I.; MATHIEU, L.; PAQUIN, J. L.; BLOCK, J. C. Influence of water chlorination on the counting of bacteria with DAPI (4',6-diamidion-2-phenyndole). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 1564-1569, 1997.

SANTOS, S. R. **Tratamento da água: monitoramento das características da qualidade da água potável**. 2007. 261p. Dissertação (Mestrado em Programação Matemática do Setor de Tecnologia) Universidade Federal do Paraná, Curitiba.2007.

SCHMALENBERGER, A.; TEBBE, C. C. Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, p. 251-262, 2003.

SCHMALENBERGER, A.; SCHWIEGER, F.; TEBBE, C. C.; Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, p.3557-3563, 2001.

SCHWARTZ, T.; HOFFMANN, S.; OBST, U. Formation of natural biofilms during chlorine dioxide and u.v. disinfection in a public drinking water distribution system. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, p. 591-601, 2003.

SCHWIEGER, F.; TEBBE, C. C. A New approach to utilize PCR-single-strand-conformation-polymorphisms for 16S rRNA gene – based microbial community analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 4870-4876, 1998.

SEIDLER, R. J.; EVANS, T. M.; KAUFMAN, J. R.; WARWICK, C. E.; LeCHEVALLIER, M. W. Limitations of standard coliform techniques. **Journal American Water Works Association**, Denver, v. 73, p. 538-542, 1981.

SELVAKUMAR, N.; DING, B. C.; WILSON, S. M. Separation of DNA strands facilitates detection of point mutations by PCR-SSCP. **BioTechniques**, Westborough, v. 22, p. 604-630, 1996.

SERVAIS, P.; BILLEN, G.; POUILLOT, P.; BENEZET, M. A pilot study of biological GAC filtration in drinking water treatment. **Journal of Water Supply: Research and Technology – Aqua**, Oxford, v. 41, p. 163-168, 1992.

SHAW, D. R.; CABELLI, V.J. R-plamid transfer frequencies from environmental isolates of *Escherichia coli* to laboratory and fecal strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 40, p. 756-764, 1980.

SINGH, R.; STINE, O.C; SMITH, D.L. Microbial diversity of biofilms in dental unit water systems. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.69, p. 3412-3420, 2003.

SZEWZYK, U.; SZEWZYK, R.; MANZ, W.; SCHLEIFER, K. H.. Microbiology safety of drinking water. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto v. 54, p. 81-127, 2000.

TADA, Y.; IHMORI, I.; YAMAGUCHI, J. Oligotrophic bacterial isolated from clinical materials. **Journal of Clinical Microbiology**, Oxford, v.33, p.493-494, 1995.

TADA, Y.; INOL, T. Use of oligotrophic bacteria for the biological monitoring of heavy metals. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.88, p.154-160, 2000.

TOKAJIAN, S.; HASHWA, F. Microbiological quality and genotypic speciation of heterotrophic bacteria isolated from potable water stored in household tanks. **Water Quality Research Journal Canada**, Ontario, v. 39, p. 64-73, 2004.

TOKAJIAN, S.; HASHWA, F. A.; HANCOCK, I. C.; ZALLOUA, P. A. Phylogenetic assessment of heterotrophic bacteria from a water distribution system using 16S rDNA sequencing. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 51, p. 325-335, 2005.

TORTORA, G. J.; BERDELL, R. F.; CASE, C. L. **Microbiologia**. São Paulo: Artmed Editora. 2005. 594p.

TYRREL, S. F.; QUINTON, J. N. Overland flow transport of pathogens from agricultural land receiving faecal wastes. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94 Supplement, 87-93, 2003.

ULTEE, A.; SOUVATZI, N.; MANIADI, K.; KÖNIG, H. Identification of the culturable and nonculturable bacterial population in ground water of a municipal water supply in Germany. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, p. 560-568, 2004.

VAEREWIJCK, M. J. M.; HUYS, G.; PALOMINO, J. S.; PORTAELS, F. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, p. 911-934, 2005.

Van der KOOIJ, D.; van LIEVERLOO, S.; SCHELLART, J.; HIEMSRA, P. Distributing drinking water without disinfectant highest achievement or height of folly? **Journal of Water Supply: Research and Technology – Aqua**, Oxford, v. 48, p. 31-37, 1999.

Van der WENDE, E.; CHARACKLIS, W.G.; SMITH, D.B. Biofilms and bacterial drinking water quality. **Water Research**, Oxford, v. 23, p. 1313-1322, 1989.

VAUGHAN, K. A. F.; WIMPEE, C. F.; REMSEN, C. C.; COLLINS, M. L. P. Detection of bacteria in environmental samples by direct PCR without DNA extraction. **BioTechniques**, Westborough, v. 31, p. 598-607, 2001.

WALKER, J. T.; KEEVIL, C. W. Study of microbial biofilms using light microscope techniques. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, p. 223-236, 1994

WARD, N. R.; WOLFE, R. L.; JUSTICE, C. A.; OLSON, B. H. The identification of gram-negative, nonfermentative bacteria from water: problems and alternative approaches to identification. **Advances in Applied Microbiology**, New York, v. 31, p. 293-365, 1986.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 697-703, 1991.

WELLER, A.E.; OETHER, D.B.; LARSEN, N.; STAHL, D.A.; RASKIN, L. The oligonucleotide probe database. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 3557-3559, 1996.

WILKINSON, J.; JENKINS, A.; WYER, M. D.; KAY, D. Modelling faecal coliform dynamics in streams and rivers. **Water Research**, Oxford, v. 29, p. 847-855, 1995.

WILLIAMS, M.M.; DOMINGO, J. W. S.; MECKES, M. C.; KELTY, C. A.; ROCHON, H. S. Phylogenetic diversity of drinking water bacteria in distribution system simulator. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.96, p. 954-964, 2004.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, New York, v.51, p.221-271, 1987.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L.; Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archae, Bacteria, and Eukarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 87, p. 4576-4579, 1990.

ANEXOS

ANEXO A – Tabela de Identificação dos microrganismos isolados no TSA em cada ponto do sistema de abastecimento – primeira coleta

Pontos de Coleta	Identificados	Código NCBI	Similaridade %
Água Captada para Tratamento	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	96
	<i>Citrobacter farmeri</i>	AF025371	97
	<i>Escherichia sp.</i>	DQ376907.1	98
	<i>Bacillus subtilis</i>	AY787000.1	97
Saída Tratamento	<i>Kartchner caverns</i>	DQ205298.1	92
	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY192145.1	100
EB 10 - Armazenada	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY192145.1	100
R 01 - Distribuição	<i>Bacillus sp.</i>	AY372926.1	98
R 02 - Armazenada	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY192145.1	100
	<i>Bacillus subtilis</i>	AY787000.1	90
R 07 – Armazenada	<i>Citrobacter farmeri</i>	AF025371.1	98
	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	99
R 08 – Distribuição	<i>Bacterium sp.</i>	AJ536688.1	94
R 08 – Armazenada	<i>Novosphingobium sp.</i>	DQ137853.2	90
R 12 - Armazenada	<i>Limnobacter sp.</i>	EF540452.1	97
	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	96
	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY192145.1	100
	<i>Citrobacter farmeri</i>	AF025371.1	98
R 14 – Armazenada	<i>Burkholderiales bacterium</i>	EF636135	86

EB – Estação de Bombeamento; R – Residência.

ANEXO B - Tabela de Identificação dos microrganismos isolados no R2A em cada ponto do sistema de abastecimento – primeira coleta

(continua)

Pontos de Coleta	Identificados	Código NCBI	Similaridade %
Água Captada para Tratamento	<i>Escherichia sp.</i>	DQ376907.1	98
	<i>Chryseobacterium sp.</i>	EF566918.1	95
	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	96
	<i>Bacillus subtilis</i>	AY787000.1	96
	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	90
	<i>Limnobacter sp.</i>	EF540452.1	97
Reservatório Estação - Distribuição	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY192145.1	94
EB 01 - Armazenada	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	94
EB 02 - Armazenada	<i>Chryseobacterium sp.</i>	AB264125.1	95
EB 03 - Armazenada	<i>Bacillus pumilus</i>	DQ073460.1	96
EB 04 - Distribuição	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ119293.1	98
EB 04 - Armazenada	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ119293.1	98
EB 05 - Armazenada	<i>Bacillus pumilus</i>	DQ073460.1	100
	<i>Chryseobacterium sp.</i>	AB264125.1	94
	<i>Limnobacter sp.</i>	EF540452.1	97
EB 06 - Armazenada	Grupo Enterico	AF208013.1	98
EB 10 - Distribuição	<i>Bacillus muciloginosus</i>	DQ898310.1	93
	<i>Bacillus licheniformis</i>	DQ118379.1	94
EB 11- Armazenada	Grupo Enterico	AF208013.1	94
	<i>Microbacterium sp.</i>	DQ119293.3	95
	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	97
	<i>Bacillus sp.</i>	AY764133.1	96
EB 13 - Armazenada	<i>Bacillus sp.</i>	AY764133.1	99
R 01 – Distribuição	<i>Brevibacillus invocatus</i>	AB112718.1	100
	<i>Bacillus sp.</i>	AY372926.1	97
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	EF540452.1	97

ANEXO B - Tabela de Identificação dos microrganismos isolados no R2A em cada ponto do sistema de abastecimento – primeira coleta

(continuação)

Pontos de Coleta	Identificados	Código NCBI	Similaridade %
R 02 – Distribuição	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	98
	<i>Bacillus subtilis</i>	DQ438973.1	95
	<i>Novosphingobium sp.</i>	DQ137853.2	94
R 02 – Armazenada	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	90
	<i>Bacillus subtilis</i>	AY787000.1	96
R 03 – Distribuição	<i>Novosphingobium sp.</i>	DQ137853.2	89
R 04 – Armazenada	<i>Bacillus badius</i>	AY8003745.1	98
R 05 - Armazenada	<i>Bacillus licheniformis</i>	DQ922951.1	100
	<i>Sphingomonas sp.</i>	AB242800.1	96
	<i>Alpha proteobacterium</i>	AB097983.1	95
R 07 – Armazenada	<i>Citrobacter farmeri</i>	AF025371	97
	<i>Uncultured bacterium</i>	DQ520179.1	96
R 08 – Distribuição	<i>Bacterium sp.</i>	AJ536688.1	94
R 08 - Armazenada	<i>Sphingobacteriales bacterium</i>	EF636193.1	95
	<i>Novosphingobium sp.</i>	DQ137853.2	89
	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	95
	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	90
	Grupo Enterico	AF208013.1	97
R 10 – Distribuição	Grupo Enterico	AF208013.1	97
R 11 – Distribuição	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	95
R 11 – Armazenada	Grupo Entérico	AF208013.1	97
	<i>Burkholderiales sp.</i>	EF636135.1	86
	<i>Chryseobacterium sp.</i>	EF566916.1	95
	<i>Acinetobacter sp.</i>	DQ834359.1	96
R 12 – Distribuição	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	96

ANEXO B - Tabela de Identificação dos microrganismos isolados no R2A em cada ponto do sistema de abastecimento – primeira coleta

(conclusão)

Pontos de Coleta	Identificados	Código NCBI	Similaridade %
R 12 - Armazenada	Grupo Entérico	AF208013.1	97
	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	95
	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	96
	<i>Limnobacter sp.</i>	EF540452.1	97
R 13 - Distribuição	<i>Microbacterium sp.</i>	DQ119293.3	96
	<i>Bacillus cereus</i>	AY315432.1	96
R 13 - Armazenada	<i>Bacillus sp.</i>	AM423146.1	95
	<i>Bacillus cereus</i>	AY315432.1	96
	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	95
	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	96
R 14 Armazenada	<i>Burkholderiales bacterium</i>	EF636135.1	86

EB – Estação de Bombeamento; R – Residência.

ANEXO C - Tabela de Identificação dos microrganismos isolados no TSA em cada ponto do sistema de abastecimento – segunda coleta

(continua)

Pontos de Coleta	Identificados	Código NCBI	Similaridade %
Água Captada para Tratamento	<i>Escherichia sp.</i>	DQ376907.1	98
	<i>Pseudomonas sp.</i>	EF675623.1	100
	<i>Chryseobacterium sp.</i>	EF566916.1	100
	<i>Acinetobacter sp.</i>	EF356018.1	100
Saída Tratamento	<i>Chryseobacterium sp.</i>	EF566916.1	100
EB 03 - Armazenada	<i>Chryseobacterium sp.</i>	EF566916.1	100
EB 06 - Distribuição	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	93
EB 10 - Armazenada	<i>Chryseobacterium sp.</i>	EF566916.1	97
EB 11 - Armazenada	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	97
EB 12 - Armazenada	<i>Chryseobacterium sp.</i>	EF566916.1	94
R 01 - Distribuição	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	100
R 01 – Armazenada	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	100
	<i>Bacillus sp.</i>	EF370050.1	98
R 02 - Distribuição	<i>Bacillus cereus</i>	AJ852040.1	100
R 02 - Armazenada	<i>Bacillus sp.</i>	EF370050.1	99
R 04 – Armazenada	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	100
R 07 – Distribuição	<i>Acinetobacter sp.</i>	DQ834359.1	100
R 07 – Armazenada	<i>Bacillus sp.</i>	AM423146.1	100
	<i>Brevibacillus invocatus</i>	AB11271.1	
R 08 – Distribuição	<i>Novosphingobium sp.</i>	DQ137853.2	90

ANEXO C - Tabela de Identificação dos microrganismos isolados no TSA em cada ponto do sistema de abastecimento – segunda coleta

(conclusão)

Pontos de Coleta	Identificados	Código NCBI	Similaridade %
R 08 – Armazenada	Grupo Entérico	AF208013.1	97
	<i>Pseudomonas sp.</i>	EF675623.1	100
R 09 – Distribuição	<i>Bacillus subtilis</i>	DQ438973.1	100
	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	96
R 09 - Armazenada	<i>Bacillus sp.</i>	AY764133.1	96
R 10 - Distribuição	<i>Acinetobacter sp.</i>	DQ834359.1	100
R 11 - Armazenada	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	100
R 12 - Distribuição	<i>Bacillus subtilis</i>	DQ438973.1	95

EB – Estação de Bombeamento; R – Residência.

ANEXO D - Tabela de Identificação dos microrganismos isolados no R2A em cada ponto do sistema de abastecimento – segunda coleta

(continua)

Pontos de Coleta	Identificados	Código NCBI	Similaridade %
Água Captada para Tratamento	<i>Escherichia sp.</i>	DQ376907.1	100
	<i>Sphingomonas sp.</i>	AB288313.1	98
	<i>Bacterium sp.</i>	AF538744.1	99
	<i>Bacterium sp.</i>	AB202184.2	99
	<i>Actinobacterium sp.</i>	AF356018.1	98
	<i>Pseudomonas sp.</i>	EF675623.1	100
	<i>Sphingomonas estrogenivorans</i>	DQ855413.1	100
Saída Tratamento	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY192145.1	98
EB 01 – Armazenada	<i>Brevibacillus inovatus.</i>	AB112718.1	100
EB 02 – Armazenada	<i>Microbacterium sp.</i>	DQ119293.3	100
	<i>Pseudomonas sp</i>	DQ192044.1	98
EB 03 – Armazenada	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	98
	<i>Bacterium sp.</i>	AJ536688.1	96
	<i>Pseudomonas sp.</i>	EF675623.1	91
EB 04 – Armazenada	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ119293.1	92
	<i>Sphingomonas sp.</i>	AB288313.1	100
EB 06 – Distribuição	<i>Chryseobacterium sp.</i>	AB264125.1	94
EB 09 – Distribuição	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	96
	<i>Bacillus cereus</i>	AY315432.1	93
	<i>Bacillus pumilus</i>	AJ494726.1	86
	<i>Sphingomonas sp</i>	AY162145.1	92
EB 10 – Armazenada	<i>Microbacterium sp.</i>	DQ119293.3	95
	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	97
EB 11 – Armazenada	<i>Bacillus sp.</i>	AY764133.1	100
EB 12 – Distribuição	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	92
EB 13 - Armazenada	<i>Brevibacillus invocatus</i>	AB112718.1	100

ANEXO D - Tabela de Identificação dos microrganismos isolados no R2A em cada ponto do sistema de abastecimento – segunda coleta

(continuação)

Pontos de Coleta	Identificados	Código NCBI	Similaridade %
R 01 - Armazenada	<i>Bacillus subtilis</i>	DQ438973.1	100
R 02 - Distribuição	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	100
	<i>Bacillus sp.</i>	EF370050.1	97
	<i>Bacillus cereus</i>	AY315432.1	100
	<i>Xantobacter flavus</i>	EF592179.1	100
R 02 - Armazenada	<i>Bacterium sp.</i>	AB202184.1	99
R 03 – Armazenada	<i>Bacterium sp.</i>	AB202184.1	100
	<i>Pseudomonas sp.</i>	EF675623.1	100
R 04 - Distribuição	<i>Sphingomonas sp.</i>	AB288313.1	99
	<i>Bacillus licheniformis</i>	DQ922951.1	100
R 04 - Armazenada	<i>Sphingomonas sp.</i>	AB288313.1	99
	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	100
	<i>Bacillus sp.</i>	EF370050.1	95
	<i>Bacterium sp.</i>	AB202184.1	100
R 05 – Distribuição	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	90
	<i>Microbacterium sp.</i>	DQ073460.1	87
	<i>Burkholderiales bacterium</i>	EF636135.1	92
R 06 - Distribuição	<i>Chryseobacterium sp.</i>	AB264125.1	94
			100
R 06 - Armazenada	<i>Novosphingobium sp.</i>	DQ13853.2	90
	<i>Acinetobacter sp.</i>	DQ834359.1	100
	<i>Pseudomonas sp.</i>	EF675623.1	100
	<i>Chryseobacterium sp.</i>	EF566916	96
R 07 - Distribuição	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	100
	<i>Microbacterium sp.</i>	DQ11923.3	100
	<i>Burkholderiales bacterium</i>	EF636135.1	91
R 07 - Armazenada	<i>Bacillus badius</i>	AY803745.1	97
	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	99
	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	93
	<i>Microbacterium sp.</i>	DQ119293.3	96
R 08 – Distribuição			100
	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	94

ANEXO D - Tabela de Identificação dos microrganismos isolados no R2A em cada ponto do sistema de abastecimento – segunda coleta

(conclusão)

Pontos de Coleta	Identificados	Código NCBI	Similaridade %
R 08 - Armazenada	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	95
	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	98
	<i>Limnobacter sp.</i>	EF540452.1	99
	<i>Chryseobacterium sp.</i>	EF566916.1	97
R 09 - Distribuição	Grupo Entérico	AF208013.1	100
R 09 - Armazenada	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	96
	<i>Burkholderiales sp.</i>	EF636135.1	89
	<i>Chryseobacterium sp.</i>	EF566916.1	92
	<i>Acinetobacter sp.</i>	DQ834359.1	90
R 10 - Distribuição	Grupo Entérico	AF208013.1	93
	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	98
	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	100
	<i>Limnobacter sp.</i>	EF540452.1	100
R 10 - Armazenada	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	99
R 11 – Distribuição	<i>Bacillus cereus</i>	AY315432.1	99
R 11 - Armazenada	<i>Bacillus cereus</i>	AY315432.1	98
	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	99
	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	100
	<i>Microbacterium sp.</i>	DQ119293.3	100
R 13 - Distribuição	<i>Burkholderiales bacterium</i>	EF636135.1	96
	<i>Pseudomonas sp.</i>	EF675623.1	98
R 13 - Armazenada	<i>Pseudomonas sp.</i>	EF675623.1	100
R 14 - Distribuição	<i>Pseudomonas sp.</i>	EF675623.1	100
	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	96

ANEXO E - Tabela de Identificação dos microrganismos encontrados pelo método de SSCP nas amostras da ETA 3 – primeira coleta

Pontos de Coleta	Identificado	Código NCBI	Similaridade %
Água Captada para tratamento	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	100
	<i>Citrobacter sp.</i>	AF025371	98
	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	96
	<i>Escherichia sp.</i>	DQ376907.1	92
	Grupo entérico	AF208013.1	100
	<i>Limnobacter sp.</i>	EF540452.1	100
	<i>Actinobacterium sp.</i>	EF356018.1	100
	<i>Bacterium sp.</i>	AB202184.2	95
	Uncultured bacterium	EF551864.1	92
Uncultured bacterium	EF590046.1	79	
Pós- tratamento – entrada reservatório	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	100
	<i>Kartechner caverns</i>	DQ205298.1	89
Saída reservatório – Distribuição	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	95

ANEXO F- Tabela de Identificação das bandas isoladas do gel de SSCP das águas coletadas nas estações de bombeamento das três regiões da cidade – primeira coleta.

(continua)

Estação de Bombeamento n°	Distribuição			Água Armazenada		
	Identificado	Código NCBI	Similaridade %	Identificado	Código NCBI	Similaridade %
01	-	-	-	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	94
	-	-	-	<i>Drinking water bacterium</i>	AY328824.1	96
02	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	<i>Bacillus pumilus</i>	DQ073460.1	95
03	-	-	-	<i>Citrobacter farmeri</i>	AF025371.1	100
	-	-	-	<i>Uncultured Bacteriodetes</i>	EF100644.1	97
	-	-	-	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ119293.1	100
04	<i>Novosphingobium sp.</i>	DQ137853.2	98	<i>Staphylococcus aureus</i>	AP009324.1	100
	<i>Chryseobacterium sp.</i>	AB264125.1	100	<i>Chryseobacterium sp.</i>	AB264125.1	88
05	-	-	-	<i>Limnobacter sp.</i>	EF540452.1	98
	-	-	-	<i>Bacillus pumilus</i>	DQ073460.1	99
	<i>Dechloromonas sp.</i>	AM421792.1	92	<i>Chryseobacterium sp.</i>	AB264125.1	99
	<i>Drinking water bacterium</i>	AY328824.1	100	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ119293.1	95
	-	-	-	<i>Sphingomonas sp.</i>	DQ162145.1	91
06	-	-	-	Grupo Enterico	AF208013.1	100
	<i>Bacillus licheniformis</i>	EF6117325	96	<i>Salmonella typhi</i>	EU118115.1	98
	<i>Xantobacter sp.</i>	AY429710.1	99	<i>Opitutus sp.</i>	X99392.1	95
	-	-	-	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	92
07	-	-	-	<i>Brevibacterium sp.</i>	AM158906.2	99
	<i>Burkholderiales bacterium</i>	EF636133.1	100	<i>Bacillaceae bacterium</i>	DQ520827.1	97

ANEXO F - Tabela de Identificação das bandas isoladas do gel de SSCP das águas coletadas nas estações de bombeamento das três regiões da cidade – primeira coleta.

(continuação)

Estação de Bombeamento nº	Distribuição			Água Armazenada		
	Identificado	Código NCBI	Similaridade %	Identificado	Código NCBI	Similaridade %
08	-	-	-	<i>Bacillus sp.</i>	EF370050.1	100
09	<i>Bacillus pumilus</i>	EF070205.1	94	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	97
				<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	AF181570.1	100
10	<i>Limnobacter sp.</i>	EF540452.1	98	<i>Chryseobacterium sp.</i>	AB264125.1	95
	<i>Dechloromonas sp.</i>	AM421792.1	96	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	AY850170.1	99
11	-	-	-	<i>Dechloromonas sp.</i>	AM421792.1	97
				<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	100
				<i>Bacillus cereus</i>	AM419181.1	99
				<i>Bacillus sp.</i>	AM423146.1	99
				<i>Chryseobacterium sp.</i>	AB264125.1	100
				<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	92
12	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	92	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	100
				<i>Bacterium sp.</i>	AJ536688.1	99
13	-	-	-	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	96
				<i>Bacillus sp.</i>	AY64133.1	100
				<i>Bacterium sp.</i>	AB202184.2	94
				<i>Dechloromonas sp.</i>	AM421792.1	92
				<i>Limnobacter sp.</i>	EF540452.1	100

ANEXO G - Tabela de Identificação das bandas isoladas do gel de SSCP das águas coletadas nas residências nas três regiões da cidade – primeira coleta.

(continua)

Residências nº	Distribuição			Água Armazenada		
	Identificado	Código NCBI	Similaridade %	Identificado	Código NCBI	Similaridade %
01	<i>Salmonella sp.</i>	AY379978.1	97	<i>Uncultured Bacillales bacterium</i>	AY532444.1	86
	<i>Sphingobacteriales bacterium</i>	EF636193.1	95	<i>Brevibacillus invocatus</i>	AB112718.1	99
				<i>Bacillus thuringiensis</i>	EF540452.1	91
02	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	100	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	95
	<i>Cohnia termotolerans</i>	AJ971483.1	99	<i>Bacillus subtilis</i>	AY787000.1	99
	<i>Bacillus subtilis</i>	AY787000.1	96	<i>Microbacterium sp.</i>	DQ119293.3	95
03	<i>Escherichia sp.</i>	DQ376907.1	98	<i>Uncultured bacterium</i>	DQ658783.1	97
	<i>Novosphingobium sp.</i>	DQ137853.2	94	<i>Alpha proteobacterium</i>	AB097983.1	95
				<i>Bacillus sp.</i>	DQ387866.1	100
04	<i>Acinetobacter sp.</i>	DQ834359.1	96	<i>Bacillus badius</i>	AY8003745.1	92
	<i>Limnobacter sp.</i>	EF540452.1	97	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	96
05	<i>Microbacterium sp.</i>	DQ119293.3	95	<i>Bacillus licheniformis</i>	DQ922951.1	99
	<i>Uncultured Ochrobacterium</i>	DQ355173.2	98	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	92
				<i>Salmonella sp.</i>	AY379978.1	89
06	Grupo Entérico	AF208013.1	86	<i>Uncultured bacterium</i>	DQ520179.1	92
07	<i>Chryseobacterium sp.</i>	AB264125.1	94	<i>Citrobacter farmeri</i>	AF025371.1	100
	<i>Porphyrobacter tepidarius</i>	AY048657.1	89	<i>Uncultured bacterium</i>	DQ520179.1	99
08		DQ658783.1		<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	90
	<i>Uncultured bacterium</i>	AY379978.1	99	<i>Bacillus sp.</i>	DQ387866.1	96
	<i>Salmonella sp.</i>		91	<i>Dechloromonas sp.</i>	AM421792.1	100
				<i>Novosphingobium sp.</i>	DQ137853.2	90
				<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	90

ANEXO G - Tabela de Identificação das bandas isoladas do gel de SSCP das águas coletadas nas residências nas três regiões da cidade – primeira coleta.

(continuação)

Residências nº	Distribuição			Água Armazenada		
	Identificado	Código NCBI	Similaridade %	Identificado	Código NCBI	Similaridade %
09	<i>Porphyrobacter tepidarius</i>	AY048657.1	99	<i>Uncultured bacterium</i>	DQ520179.1	100
				<i>Grupo Entérico</i>	AF208013.1	97
10	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	AP009324 AY850170.1	97 99	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	95
				<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	98
				<i>Flectobacillus sp.</i>	AY308840.1	98
				<i>Drinking water bacterium</i>	AY328824.1	97
11	<i>Sphingomonas sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	AY162145.1 EF675623.1	100 100	<i>Actinobacterium sp.</i>	DQ834359.1	90
				<i>Burkholderiales sp.</i>	EF636135.1	99
				<i>Grupo Enterico</i>	AF208013.1	99
				<i>Alpha proteobacterium</i>	AB097983.2	100
				<i>Chryseobacterium sp</i>	EF566916.1	100
				<i>Limnobacter sp</i>	EF540452.1	87
12	<i>Uncultured bacterium</i> <i>Porphyrobacter tepidarius</i>	DQ520179.1 AY048657.1	100 88	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	99
				<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	96
				<i>Uncultured bacterium</i>	DQ327679.1	93
				<i>Dechloromonas sp.</i>	AM421792.1	89

ANEXO G - Tabela de Identificação das bandas isoladas do gel de SSCP das águas coletadas nas residências nas três regiões da cidade – primeira coleta.

(conclusão)

Residências nº	Distribuição			Água Armazenada		
	Identificado	Código NCBI	Similaridade %	Identificado	Código NCBI	Similaridade %
13	<i>Staphylococcus aureus</i>	AP009324.1	97	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	88
	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	100	<i>Pseudomonas sp.</i>	EF675623.1	92
	<i>Pseudomonas sp.</i>	EF675623.1	100	<i>Bacillus cereus</i>	AY315432.1	90
	<i>Bacillus sp.</i>	DQ387866.1	98	<i>Limnobacter sp.</i>	EF540452.1	95
14	<i>Cohnia termotolerans</i>	AJ971483.1	97	<i>Citrobacter farmeri</i>	AF025371.1	96
	<i>Dechloromonas sp.</i>	AM421792.1	92	<i>Pseudomonas sp.</i>	EF675623.1	100
				<i>Burkholderiales bacterium</i>	EF636135.1	95

ANEXO H - Tabela de Identificação dos microrganismos encontrados pelo método de SSCP nas amostras da ETA 3 – segunda coleta

Pontos de Coleta	Identificado	Código NCBI	Similaridade %
Água Captada para Tratamento	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	100
	<i>Citrobacter sp.</i>	AF025371	100
	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	95
	<i>Uncultured</i>	AM691114.1	95
	<i>Methylobacterium sp.</i>		
	<i>Escherichia sp.</i>	DQ376907.1	92
	Grupo Entérico	AF208013.1	90
	<i>Limnobacter sp.</i>	EF540452.1	90
	<i>Sphingomonas estrogenivorans</i>	DQ855413.1	89
	<i>Actinobacterium sp.</i>	EF356018.1	85
	<i>Bacterium sp.</i>	AB202184.2	96
	<i>Uncultured bacterium</i>	EF551864.1	100
	<i>Shigella flexneri</i>	EU009188.1	99
Pós- tratamento – entrada reservatório	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	99
	<i>Sphingomonas estrogenivorans</i>	DQ855413.1	99
Saída reservatório – Distribuição	<i>Acidorovax sp.</i>	AJ534865.1	97

ANEXO I - Tabela de Identificação das bandas isoladas do gel de SSCP das águas coletadas nas estações de bombeamento das três regiões da cidade – segunda coleta.

(continua)

Estação de Bombeamento nº	Distribuição			Água Armazenada		
	Identificado	Código NCBI	Similaridade %	Identificado	Código NCBI	Similaridade %
01	-	-	-	<i>Streptomyces sp.</i>	EU010382.1	100
	-	-	-	<i>Bacterium sp.</i>	AF538744.1	100
	-	-	-	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	99
02	-	-	-	<i>Xantobacter flavus</i>	EF592179.1	100
	-	-	-	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	92
	-	-	-	<i>Microbacterium sp.</i>	DQ119293.1	99
03	-	-	-	<i>Uncultured Bacteriodes</i>	EF100644.1	98
	-	-	-	<i>Shigella fleneri</i>	EU009188.1	98
	-	-	-	<i>Pseudomonas sp.</i>	EF675623.1	100
04	<i>Microbacterium resistens</i>	EF619412.1	95	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	EU082832.1	96
	<i>Paenibacillus sp.</i>	AM402945.1	95	<i>Bacillus pumillus</i>	AJ494726.1	99
	<i>Glacial ice bacterium</i>	AF479381.1	94	<i>Bacillus megaterium</i>	EF154249.1	97
05	<i>Uncultured bacterium</i>	EF551864.1	100	<i>Pseudomonas sp.</i>	EF675623.1	91
				<i>Chryseobacterium sp.</i>	EF566916.1	100
06				<i>Salmonella typhi</i>	EU118115.1	98
	<i>Bacillus anthracis</i>	AB190218.1	100	<i>Opitutus sp.</i>	X99392.1	95
	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	94	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	92
				<i>Kartchner caverns</i>	DQ205298.1	92
			<i>Dechloromonas sp.</i>	AM421792.1	99	

ANEXO I - Tabela de Identificação das bandas isoladas do gel de SSCP das águas coletadas nas estações de bombeamento das três regiões da cidade – segunda coleta.

(conclusão)

Estação de Bombeamento n°	Distribuição			Água Armazenada		
	Identificado	Código NCBI	Similaridade %	Identificado	Código NCBI	Similaridade %
07	<i>Salmonella sp.</i>	AY379978.1	97	<i>Bacillus sporothermodurans</i>	AF329476	95
	<i>Microbacterium sp.</i>	DQ119293.3	100	<i>Escherichia sp.</i>	DQ376907.1	98
08	-	-	-	<i>Bacillus sp.</i>	EF370050.1	89
	-	-	-	<i>Bacillus muciloginosus</i>	DQ898310.1	93
09	<i>Paenibacillus elgii</i>	AY090110.1	95	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	AF181570.1	97
	<i>Uncultured bacterium</i>	EF574413.1	98	Grupo Enterico	AF208013.1	95
10	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	EF672060.1	96	<i>Sphingobacteriales bacterium</i>	EF636193.1	93
	<i>Shigella flexneri</i>	EU009188.1	98	<i>Chryseobacterium sp.</i>	AB264125.1	100
11	-	-	-	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	AY850170.1	89
	-	-	-	<i>Dechloromonas sp.</i>	AM421792.1	86
12	<i>Dechloromonas sp.</i>	AM421792.1	100	<i>Sphingomonas strogenovorans</i>	DQ855413.1	100
	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	AF181570.1	100	<i>Cohnella panacarvi</i>	AB271056.1	99
13	-	-	-	<i>Pseudomonas sp.</i>	EF675623.1	95
	-	-	-	<i>Uncultured bacterium</i>	EF574413.1	88
13	-	-	-	<i>Bacillus subtilis</i>	DQ438973.1	98
	-	-	-	<i>Chryseobacterium sp.</i>	EF566916.1	99
13	-	-	-	<i>Shigella flexneri</i>	EU009188.1	95
	-	-	-	<i>Salmonella typhi</i>	EU118115.1	100
13	-	-	-	<i>Bacterium sp.</i>	AB202184.2	98
	-	-	-	<i>Dechloromonas sp.</i>	AM421792.1	90
13	-	-	-	<i>Liminobacter sp.</i>	EF540452.1	94
	-	-	-	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	AY850170.1	90

ANEXO J - Tabela de Identificação das bandas isoladas do gel de SSCP das águas coletadas nas residências nas três regiões da cidade – segunda coleta.

(continua)

Residências nº	Distribuição			Água Armazenada		
	Identificado	Código NCBI	Similaridade %	Identificado	Código NCBI	Similaridade %
01	<i>Dechloromonas sp.</i>	AM421792.1	94	<i>Uncultured Bacillales</i>	AY532444.1	100
	<i>Citrobacter farmeri</i>	AF025371.1	99	<i>Bacillus subtilis</i>	AY787000.1	94
				<i>Salmonella typhi</i>	EU118115.1	92
02				<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	97
	<i>Bacillus sp.</i>	DQ387866.1	89	<i>Microbacterium sp.</i>	DQ119293.3	98
	<i>Dechloromonas sp.</i>	AM421792.1	92	<i>Uncultured bacterium</i>	DQ658783.1	97
	<i>Novosphingobium sp.</i>	DQ137853.2	95	<i>Chryseobacterium sp.</i>	EF566916.1	97
	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	100			
03	<i>Flavobacteriaceae sp.</i>	AY278614.1	94	<i>Alpha proteobacterium</i>	AB097983.1	100
	<i>Thiobacillus sp.</i>	X97534.1	77	<i>Bacillus sp.</i>	DQ387866.1	100
	<i>Dechloromonas sp.</i>	AM421792.1	93	<i>Drinking water bacterium</i>	AY328822.1	89
04				<i>Bacillus badius</i>	AY8003745.1	99
	<i>Bacillaceae bacterium</i>	DQ520827.1	97	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	95
	<i>Opitutus sp.</i>	X99392.1	95	<i>Staphylococcus aureus</i>	AP009324.1	95
	<i>Shigella flexneri</i>	EU009188.1	98	<i>Bacillus licheniformis</i>	DQ922951.1	99
05				<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	93
	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	98	<i>Salmonella sp.</i>	AY379978.1	94
	<i>Bacillus subtilis</i>	AY787000.1	99			
06				<i>Uncultured bacterium</i>	DQ520179.1	100
	<i>Uncultured</i>	AM691114.1	99	<i>Sphingomonas estrogenovorans</i>	DQ855413.1	100
	<i>Methylobacterium sp.</i>			<i>Uncultured bacterium</i>	EF551864.1	90
	<i>Pseudomonas orzyhabitans</i>	AY850170.1	99			

ANEXO J - Tabela de Identificação das bandas isoladas do gel de SSCP das águas coletadas nas residências nas três regiões da cidade – segunda coleta.

(continuação)

Residências nº	Distribuição			Água Armazenada		
	Identificado	Código NCBI	Similaridade %	Identificado	Código NCBI	Similaridade %
07	<i>Actinobacterium sp.</i>	EF356018.1	100	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	AF181570.1	99
	<i>Burkholderiales sp.</i>	EF636135.1	96	<i>Bacillus cereus</i>	AJ852040.1	99
	<i>Alpha proteobacterium</i>	EF566916.1	96	<i>Xantobacter sp.</i>	EF592179.1	99
08				<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	93
	<i>Microbacterium sp.</i>	DQ119293.3	97	<i>Limnobacter sp.</i>	EF540452.1	100
	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	96	<i>Chryseobacterium sp.</i>	EF566916.1	100
	<i>Salmonella typhi</i>	EU118115.1	98	<i>Burkholderiales bacterium</i>	EF694699.1	97
09				<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	100
	<i>Thiobacillus sp.</i>	X97534.1	89	<i>Cohnella panacarvi</i>	AB271056.1	100
	<i>Dechloromonas sp.</i>	AM421792.1	100	<i>Shigella flexneri</i>	EU009188.1	99
10	<i>Escherichia sp.</i>	DQ376907.1	99	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	100
				<i>Acinetobacter</i>	DQ83459.1	100
	<i>Porphyrobacter sp.</i>	AB299749.1	100			
	<i>Uncultured bacterium</i>	DQ327679.1	99	<i>Limnobacter sp.</i>	EF540452.1	99
	<i>Acidovorax sp.</i>	AJ592179.1	99	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	90
			<i>Acinetobacter sp.</i>	DQ834359.1	91	
	<i>Streptomyces</i>	EU010382.1	100			
	<i>Grupo Entérico</i>	AF208013.1	93			

ANEXO J - Tabela de Identificação das bandas isoladas do gel de SSCP das águas coletadas nas residências nas três regiões da cidade – segunda coleta

(conclusão)

Residências nº	Distribuição			Água Armazenada		
	Identificado	Código NCBI	Similaridade %	Identificado	Código NCBI	Similaridade %
11	<i>Paeniobacillus ehimensis</i>	EF025575.1	100	<i>Bacillus sp.</i>	AM423146.1	92
	<i>Drinking water bacterium</i>	AY328822.1	99	<i>Bacillus cereus</i>	AY315432.1	100
	<i>Porphyrobacter sp.</i>	AB299749.1	98	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	94
				<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	99
12				<i>Microbacterium sp.</i>	DQ119293.3	100
	<i>Shigella flexneri</i>	EU009188.1	100	Grupo Entérico	AF208013.1	87
	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	AF181570.1	99	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	97
				<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	95
13	<i>Bacillus licheniformis</i>	DQ922951.1	99	<i>Limnobacter sp.</i>	EF540452.1	96
	<i>Flectobacillus sp.</i>	AY308840.1	99	<i>Bacillus sp.</i>	AM423146.1	92
	<i>Dechloromonas sp.</i>	AM421792.1	97	<i>Bacillus cereus</i>	AY315432.1	92
	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	100	<i>Sphingomonas sp.</i>	AY162145.1	90
14				<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	99
	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	99	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ192044.1	100
	<i>Staphylococcus aureus</i>	AP009324.1	100	<i>Actinobacterium sp.</i>	AF356018.1	100
	<i>Thiobacillus sp.</i>	X97534.1	89	<i>Bacillus megaterium</i>	EF154249.1	97
	<i>Opitutus sp.</i>	X99392	95	<i>Burkholderiales bacterium</i>	EF636135.1	95
	<i>Dechloromonas sp.</i>	AM421792.1	100			